

**MORPHOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN
EXPERIMENTELLEN HIRNTUMOREN
DES KANINCHENS**

Ingrid Wriedt-Lübbe

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551910_0065

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Prof. Dr. E. Dahme)
am Institut für Tierpathologie der Universität München
Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. D. Stavrou

MORPHOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN EXPERIMENTELLEN HIRNTUMOREN DES KANINCHENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ingrid Wriedt-Lübbe
aus Sobernheim

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Priv.-Doz. Dr. D. Stavrou
Korreferent: Prof. Dr. P. Walter

Tag der Promotion: 21. Februar 1975



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	
1. Experimentelle Induktion neurogener Tumoren	4
2. S-100-Protein	8
C. PROBLEMSTELLUNG	12
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
1. Material und Methodik	
1.1. Tierversuche	14
1.2. Histologische Untersuchung	14
1.3. Immunologische Untersuchungen	
1.3.1. Immunodiffusion	15
1.3.2. Quantitative Immunelektrophorese	19
1.3.3. Komplementbindungsreaktion	20
1.3.4. Immunofluoreszenz	22
2. Ergebnisse	
2.1. Morphologie	
2.1.1. Makroskopische Befunde	22
2.1.2. Histologische Befunde	24
2.2. Nachweis des S-100-Proteins	
2.2.1. Immunodiffusion	38
2.2.2. Quantitative Immunelektrophorese	40
2.2.3. Komplementbindungsreaktion	43
2.2.4. Immunofluoreszenz	45
E. DISKUSSION	47
F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	58
G. LITERATURVERZEICHNIS	60

A. EINLEITUNG

Erforschung, Prophylaxe und Therapie einer Krankheit werden oft erst durch das Tierexperiment ermöglicht. Dies dürfte auch für die Tumoren des Nervensystems (NS) verschiedener Species gelten, deren Ursachen und deren Morphogenese noch weitgehend ungeklärt sind. Da die relativ selten auftretenden spontanen NS-Tumoren systematische Untersuchungen nur in beschränktem Umfang erlauben, besteht gerade für die Neuroonkologie eine zwingende Notwendigkeit zu umfassenden experimentellen Untersuchungen. Die ätiologische und formalpathogenetische Erforschung von NS-Tumoren im Tierversuch setzt jedoch eine zuverlässige und standardisierte Tumorreproduktion sowie deren Vergleichbarkeit mit den spontanen neurogenen Tumoren voraus.

Die experimentelle Erzeugung von Hirntumoren ist lange Zeit nur durch lokale Applikation von carcinogenen Kohlenwasserstoffverbindungen möglich gewesen, wobei hauptsächlich Methylcholanthren (WEIL, 1938; SELIGMAN u. SHEAR, 1939; SCHIEFER, 1958; JÄNISCH, 1966) und Benzypren (ZIMMERMAN u. ARNOLD, 1943; JÄNISCH, 1966) verwandt wurden.

Diese allgemein carcinogen wirksamen Substanzen haben keine spezifisch neurotrope Wirkung und führen zu Neoplasien, die mit den spontanen Hirntumoren kaum vergleichbar sind. Außerdem erfordert die Applikation derartiger Stoffe aufwendige operative Techniken, die eine mechanische Hirntraumatisierung verursachen. So konnten diese Versuche bislang nur wenig zur Aufklärung spezieller neuroonkologischer Fragen beitragen. In Einzelfällen sind Gliome auch nach oraler Gabe von Fluorenylazetamid-Verbindungen aufgetreten (SYMIONIDIS, 1954), wobei die Tumorausbeute jedoch äußerst gering war.

Für die Neuroonkologie bedeutete es daher einen entscheidenden Fortschritt, als es DRUCKREY et al. (1964) erstmals gelang, selektiv und regelmäßig auf resorptivem Weg - durch wiederholte intravenöse Injektionen von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNH) - neurogene Tumoren bei der Ratte zu erzeugen. Diese Einführung der Acyl-Alkyl-

Nitrosamide als Resorptivcarcinogene durch DRUCKREY et al. (1964) beruhte auf der Beobachtung von MAGEE und BARNES (1956), daß das Dimethylnitrosamin bei der Ratte hepatocarcinogen wirkt.

Bei den in den folgenden Jahren von DRUCKREY und Mitarbeitern durchgeführten Untersuchungen über Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der carcinogenen Wirkung erwiesen sich viele dieser N-Nitroso-Verbindungen im Tierversuch als Carcinogene, wobei die Besonderheit darin besteht, daß viele Substanzen dieser Gruppe selektiv auf ein bestimmtes Organ bzw. Organsystem wirken, im Falle des MNH fast ausschließlich auf das NS.

Für das Problem des Wirkungsmechanismus und der damit zusammenhängenden Organotropie dieser Stoffe ist bis jetzt noch keine ausreichende und endgültige Erklärung gefunden worden. Die verschiedenen Autoren weisen jedoch darauf hin, daß die carcinogene Wirkung wahrscheinlich auf einer irreversiblen Veränderung genetisch aktiver Nucleinsäuren beruht. So hatte man zunächst der Alkylierung des DNS-Guanins in der N7-Position besondere Aufmerksamkeit geschenkt, nachdem MAGEE und FARBER (1962) die N7-Methylierung des Guanins in der DNS verschiedener Organe nachweisen konnten. Mit der "Alkylierungstheorie" (MAGEE u. BARNES, 1967; DRUCKREY et al., 1967, 1969) konnte man zwar den carcinogenen Effekt dieser Stoffgruppe erklären, nicht aber deren auffällige Organotropie.

Erst die in jüngster Zeit von RAJEWSKY und Mitarbeitern (GOTH u. RAJEWSKY, 1974; GOTH, 1974) aufgeworfene Frage nach dem funktionellen Verhalten der Zelle nach Einwirkung eines Carcinogens hat zu einem erweiterten Einblick in die molekulare Biologie der malignen Transformation geführt. Am Beispiel des N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoffs (ÄNH) wurde gezeigt, daß neben N7-Äthylguanin auch O6-Äthylguanin auftritt, und daß O6-Äthylguanin aus Gehirn-DNS sehr viel langsamer ($t^{1/2} = 229$ h) als aus Leber-DNS ($t^{1/2} = 36$ h) eliminiert wird. Die selektive Persistenz von O6-Alkylguanin in der DNS des Rattenhirns konnte inzwischen auch für das O6-Methylguanin bestätigt werden (KLEIHUES, 1974). Eine Alkylierung der DNS in der O6-Position des Guanins ist potentiell mutagen, da sie bei der nächstfolgenden

DNS-Replikation eine falsche Basenpaarung bewirken kann. Die verminderte Fähigkeit von Gehirnzellen, 06-Alkylguanin aus ihrer DNS zu eliminieren, könnte daher die spezifische neurotrope Wirkung von ÄNH und MNH erklären.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Experimentelle Induktion neurogener Tumoren

Die chemischen, physikalischen und carcinogenen Eigenschaften des MNH wurden in der grundlegenden Arbeit von DRUCKREY et al. (1967) beschrieben. Über die teratogene Wirksamkeit des MNH, das bei der Ratte zu Gehirn- und Extremitätenmißbildungen führt, berichteten v. KREYBIG (1965) sowie KUPFER und KUPFER (1971).

In der Folgezeit wurde das von DRUCKREY et al. (1964, 1965, 1967) erarbeitete Modell der postnatalen Erzeugung neurogener Tumoren durch chronische Gaben von N-Nitroso-Verbindungen bei erwachsenen Ratten durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt und im Rahmen neuroonkologischer Studien angewandt (THOMAS et al., 1967, 1968; WECHSLER et al. 1969; STAVROU, 1969, 1970 a, 1970 b, 1971; SWENBERG et al., 1972). Die neuroonkogene Wirksamkeit des MNH hat sich seitdem auch beim Kaninchen (JÄNISCH u. SCHREIBER, 1967, 1969; SCHREIBER et al., 1969; STAVROU, 1969; KLEIHUES et al., 1970) und beim Hund (WARZOK et al., 1970; STAVROU u. HAGLID, 1972) erwiesen.

Die Induktion neurogener Tumoren beim Kaninchen durch chronische Gabe von MNH wurde erstmals von JÄNISCH und SCHREIBER (1967) und von SCHREIBER et al. durchgeführt. Eine Dosis von 10 mg MNH/kg Körpergewicht, die in 14tägigen Abständen intravenös verabreicht wurde, führte bei 70 % der Tiere zu Tumoren des ZNS, hauptsächlich im Gehirn und nur in 2 Fällen auch im Rückenmark (RM). Die meisten dieser Neoplasien wurden histologisch als multifforme Glioblastome, eines als Astrozytom und einige Fälle wurden auch als Sarkome klassifiziert.

STAVROU (1969) und KLEIHUES et al. erhielten bei gleicher Versuchsanordnung eine etwa gleich große Tumorausbeute, sie fanden jedoch keine Tumoren im RM. Bei diesen Hirntumoren handelt es sich ausschließlich um Gliome und Ependymome. Das Gliommaterial setzt sich vorwiegend aus pleomorphen Oligodendrogliomen bzw. Glioblasto-

men, pleomorphen Mischgliomen und einigen isomorphen Oligodendrogliomen zusammen. Der größte Teil ist in den subependymären und paraventrikulären Regionen lokalisiert, in welchen auch die beschriebenen "Mikrotumoren" fast ausschließlich anzutreffen sind (STAVROU, 1969, 1970 a).

Die Anwendung dieser Methoden zur Erzeugung von neurogenen Tumoren im Tierversuch und die Zulässigkeit von Analogieschlüssen bei vergleichenden Untersuchungen haben jedoch zur Voraussetzung, daß die experimentellen neurogenen Tumoren neben die entsprechenden spontanen Tumoren gestellt werden können und verlangen daher nicht zuletzt ein Einteilungsschema, das sowohl den spontanen als auch den experimentellen Neoplasien gerecht wird.

Eine Klassifikation der menschlichen Hirngeschwülste auf der Grundlage einer zyto-genetischen Ordnung wurde von BAILEY und CUSHING (1926) vorgeschlagen und ihr Werk: "A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis", in dem sie die Gliomtypen von den embryonalen Reifungsstufen der Gliazellen ableiten und prognostisch beurteilen, dient im Prinzip auch heute noch als Grundlage für die morphologische Einteilung der glialen Hirntumoren. Das von ZÜLCH (1956) erarbeitete Klassifikationsschema für die menschlichen NS-Tumoren, das auf einer Vereinfachung des Schemas von BAILEY und CUSHING beruht, berücksichtigt nicht nur das vielfältige Erscheinungsbild dieser Tumoren, sondern in verstärktem Maße auch deren biologisches Verhalten. Diese Ordnung wird im allgemeinen auch für die Klassifikation der Gliome bei Tieren angewandt (DAHME u. SCHIEFER, 1960; SCHIEFER u. DAHME, 1962). KERNOHAN et al. (1949) bemühen sich ebenfalls um eine übersichtlichere Ordnung des Schemas von BAILEY und CUSHING, indem sie das BRODERSsche "grading" auf die Gliome anwenden, und beurteilen die Malignität nach der Häufigkeit der Mitosen und dem Ausmaß der Atypie. Die Unterteilung erfolgt in 4 Malignitätsstufen. Dabei wird unterstellt, daß die malignen Geschwülste durch einen fortschreitenden Prozeß der Entdifferenzierung aus isomorphen Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Ependymomen hervorgehen. RINGERTZ (1950) greift diesen Vorschlag auf und

vereinfacht das "grading" auf 3 Stufen. Dieses Prinzip wird bei der Klassifikation spontaner Gliome des Menschen (MÜLLER u. SCHRÖDER, 1968) und verschiedener Tierspecies (STAVROU et al., 1970) angewandt. Dabei werden von STAVROU et al. (1970) die glialen Tumoren nach formalen Gesichtspunkten in 2 Hauptgruppen, die primär isomorphen und die primär heteromorphen Gliome (Mischgliome) eingeteilt. Die weitere Differenzierung der primär isomorphen Gliome erfolgt in den 3 Malignitätsstufen, die dem Grad I - III nach RINGERTZ entsprechen. Der Grad III umfaßt nicht nur die durch fortschreitende Anaplasie aus dem Grad II entstandenen Glioblastome, sondern auch die primären Glioblastome, die sich ohne nachweisbare Vorstufen als pleomorphe Gliome entwickelt haben. Dieses Einteilungsprinzip wird inzwischen auch von GÜTHERT und WARZOK (1974) angewandt.

Für die experimentellen Gliome schlägt STAVROU (1969, 1970 a, 1971) ein Schema vor, das sowohl die von ZÜLCH (1956) ausgearbeiteten Differenzierungsmerkmale, als auch die im Experiment gemachten Beobachtungen berücksichtigt, und teilt diese in primär isomorphe Gliome (Oligodendrogliome und Astrozytome), primär heteromorphe Gliome und pleomorphe Gliome ein. Diese Ordnung erscheint für die experimentellen Gliome besonders geeignet und soll daher auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung finden.

Das Spektrum des bisher erzeugten NS-Tumormaterials, das in erster Linie aus Versuchen mit Ratten stammt, ist dem der menschlichen Geschwülste sehr ähnlich (THOMAS u. KERSTING, 1964; IVANKOVIC, 1967; ZÜLCH, 1969) ist aber bis zu einem gewissen Grade von der Applikationsart und der Dosierung abhängig (THOMAS et al., 1968; THOMAS u. BOLLMANN, 1968).

STAVROU (1971) kommt anhand seiner vergleichenden morphologischen, enzymtopochemischen sowie isoenzymanalytischen Studien zu dem Ergebnis, daß es sich bei den NS-Tumoren des Menschen und den experimentellen NS-Tumoren verschiedener Tierspecies um vergleichbare Neoplasien handelt. Neben den weitgehenden Gemeinsamkeiten beider Tumorgruppen werden aber auch einige, wahrscheinlich speciesbedingte bzw. durch das Experiment hervorgerufene Unter-

schiede (z. B. das Überwiegen der malignen Gliome bei den experimentell induzierten Hirntumoren) hervorgehoben. Außerdem traten im Rahmen dieser Untersuchungen in größerem Umfang mehr oder weniger ausgedehnte Gliaproliferationen und "Mikrotumoren" auf, die als Frühstadien der Gliomentwicklung angesehen werden und morphologisch faßbare Anhaltspunkte für die mögliche formale Entstehung und Entwicklung dieser Hirntumoren darstellen. Neben diesen Frühstadien lassen sich auch die späteren Entwicklungsstufen, die bis zum makroskopisch sichtbaren Tumor mit seinen verschiedenen Differenzierungsstufen reichen, mit fließenden Übergängen nachweisen.

JÄNISCH et al. (1970) sowie STAVROU und HAGLID (1973 a) stellen in weitgehend übereinstimmenden Befunden die Gesetzmäßigkeiten in der Entwicklung dieser experimentellen Hirntumoren heraus. Dies wird auch durch das gleichzeitige Auftreten mehrerer Tumoren in unterschiedlichen Entwicklungsphasen in demselben Hirn veranschaulicht.

Die experimentelle Induktion von ZNS-Geschwülsten bei erwachsenen Tieren hat auch gezeigt, daß diese Tumoren aus ausgereiften Hirnbestandteilen hervorgehen können und daß sie nicht unbedingt auf der Grundlage von Keimversprengungen bzw. Keimpersistenz entstehen (JÄNISCH u. SCHREIBER, 1969).

Das Erscheinungsbild der primär heteromorphen Gliome und der heteromorphen "Mikrotumoren", die offensichtlich durch gleichzeitige Transformation mehrerer proliferationsfähiger Zellelemente eines Hirnareals entstanden sind, hat zu der Annahme geführt, daß auch im ZNS eine Feldtransformation im Sinne von WILLIS (1960) vorstellbar ist (KERSTING, 1961). Nach der sog. Feldtheorie von WILLIS darf der Ausgangspunkt eines Tumors nicht nur in einem einzigen Zentrum gesehen werden. Vielmehr beginnt das ganze befallene Gewebefeld gleichzeitig zu wachsen, es vergrößert sich durch zelluläre Proliferation und erfährt innerhalb seines Areals eine progressive blastomatöse Umwandlung. ZÜLCH (1969) läßt diese Theorie nur für die diffusen Gliome, wie sie z. B. von NEVIN (1938), SCHEINKER und EVANS (1943) sowie DUNN und KERNOHAN (1957) beschrieben werden, gelten

und lehnt im übrigen die Auffassung eines kleineren oder größeren transformierten Feldes infolge fehlender Befunde ab. Die im Experiment beobachtete multizentrische Geschwulstentstehung - wie sie von JÄNISCH et al. sowie von STAVROU und HAGLID (1973 a) beschrieben wird - zeigt jedoch, daß bei der Nitrosamid-Cancerisierung des NS der Ratte die Feldtransformation als formales Entwicklungsprinzip bei der Entstehung neurogener Tumoren häufig beobachtet wird.

2. S-100-Protein

In den letzten Jahren wurden aus dem NS verschiedener Species einige niedermolekulare Proteine isoliert, die ausschließlich im NS und vornehmlich in den Gliazellen vorkommen (Lit. bei SCHNEIDER et al., 1973). Eines davon, das S-100-Protein, hat in der Hirntumordiagnostik besondere Bedeutung erlangt. Die meisten experimentellen Hirntumoren, sowohl der Ratte als auch des Kaninchens, sind im histologischen Bild sehr pleomorph und nicht ohne weiteres einer bestimmten Tumorgruppe zuzuordnen. Das Vorhandensein des S-100-Proteins in einem solchen Tumor kann jedoch als Beweis dafür angesehen werden, daß dieser zumindest zum Teil aus glialem Gewebe besteht.

Das S-100-Protein gehört zu den am eingehendsten untersuchten hirnspezifischen Proteinen. Von MOORE und MCGREGOR (1965) wurde es bei elektrophoretischen Untersuchungen entdeckt und von MOORE (1965) aus Rinderhirn in reiner Form isoliert und charakterisiert. Das sehr saure Protein - zu etwa 30 % sind Glutamin- und Asparaginsäurereste beteiligt - wurde von ihm S-100-Protein genannt, weil es in 100 %iger Ammoniumsulfatlösung bei pH 7 löslich ist. Die Angaben über das Molekulargewicht schwanken zwischen 19 500 und 30 000 (MOORE; DANNIS u. LEVINE, 1969; CICERO et al., 1970; STEWART, 1972). Über das Auftreten mehrerer S-100-Fraktionen bei der elektrophoretischen Auftrennung von Gehirnproben verschiedener Säugetier-species berichten GOMBOS et al. (1966) und TARDY et al. (1968). Das Erscheinen der Untereinheiten ist abhängig von dem System, das zur Auftrennung benutzt wird (VINCENDON et al., 1967); ob die Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen dafür erforderlich ist, steht noch nicht fest

(CALISSANO et al., 1969; HAGLID u. STAVROU, 1973). Die Untersuchungen von GOMBOS et al. (1971 a) zeigen, daß das S-100-Protein aus einer schnell und einer langsam wandernden Komponente besteht, die in verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich verteilt sind, was auf eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation der beiden Fraktionen hinweist (FILIPOWICZ et al., 1968; GOMBOS et al., 1971 b).

Das S-100-Protein, das bei allen bisher untersuchten Species - Mensch, Säugetiere, Vögel, Reptilien, Fische, Insekten - gefunden wurde, weist eine ungewöhnlich enge serologische Verwandtschaft bei den verschiedensten Tierarten auf (MOORE u. MCGREGOR; MOORE; LEVINE u. MOORE, 1965; MOORE u. PEREZ, 1968; KESSLER et al., 1968). Der S-100-Gehalt der einzelnen Gehirnregionen ist unterschiedlich; das Kleinhirn weist im allgemeinen eine höhere Konzentration auf als das Großhirn. Im menschlichen Großhirn enthält die weiße Substanz mehr S-100 als die graue Substanz. Die Konzentration im Rattengehirn beträgt 0,3 mg/g Feuchtgewicht (MOORE et al., 1968; MOORE u. PEREZ, 1968).

Im Laufe der postnatalen Entwicklung des Gehirns kann sowohl bei der Ratte (MOORE u. PEREZ, 1968; HERSCHMAN et al., 1971) als auch bei der Maus (CICERO et al., 1972) bereits am 1. - 2. Tag das S-100-Protein gemessen werden. Ein wesentlich höherer S-100-Gehalt tritt jedoch erst zu einem Zeitpunkt auf, an dem die eigentlichen zellulären Differenzierungen bereits abgeschlossen sind und die "funktionelle Reifung" des ZNS beginnt (CICERO et al., 1972).

Große Bedeutung kommt dem Problem der zellulären Lokalisation des S-100-Proteins zu. Zunächst glaubte man aufgrund seines Verteilungsmusters, daß es ein neuronales Protein sei (MOORE), tatsächlich aber wurde es im ZNS in den Gliazellen (HYDÉN u. McEWEN, 1966; CICERO et al., 1970; PEREZ et al., 1970) und im PNS gefunden, wo es wahrscheinlich in den SCHWANNschen Zellen gebildet wird (PEREZ et al.). Andere, vor allem Immunofluoreszenz-Untersuchungen, ergaben auch ein Vorkommen in den Neuronen (HYDÉN u. McEWEN; SVIRIDOV et al., 1972; HAGLID et al., 1973). HAGLID et al. (1974) konnte das S-100-Protein in den postsynaptischen Membranen der Nervenzellen nach-

weisen und vermutet eine Beziehung zwischen diesem Gliazellprotein und der synaptischen Übertragung, da bisher noch niemand zeigen konnte, daß das Protein in den Neuronen selber synthetisiert wird. Das S-100-Protein liegt in den Gliazellen in wesentlich höherer Konzentration als in den Neuronen vor, und zwar in einem Verhältnis von 10 : 1 (HAGLID, 1974). Auch die immunologischen Studien an verschiedenen glialen Gewebekulturen lassen annehmen, daß das S-100-Protein im ZNS vorwiegend in den Gliazellen synthetisiert wird (BENDA et al., 1968; LIGHTBODY et al., 1970; PFEIFFER et al., 1970; HERSCHMAN, 1971). Die Frage nach dem Ort der Synthese wird von ZOMZELY-NEURATH et al. (1973) dahingehend beantwortet, daß das S-100-Protein fast ausschließlich durch freie Ribosomen synthetisiert wird. Das bedeutet, daß das Protein nicht aus der Zelle heraustransportiert, sondern in der Zelle selbst benötigt wird.

Die Funktion des S-100-Proteins ist noch nicht bekannt, doch lassen die folgenden Kriterien auf eine spezifische funktionelle Rolle im NS schließen: Das Protein ist spezifisch für das NS, kommt dort in hoher Konzentration vor und zeigt im Verlauf der Phylogenese eine ungewöhnliche immunologische Stabilität (LEVINE u. MOORE; MOORE u. PEREZ, 1968; KESSLER et al.). Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang zwischen der S-100-Konzentration und bestimmten Gedächtnisleistungen. HYDÉN und LANGE (1970) beobachteten bei einem aktiven Lernprozeß der Ratte ein Ansteigen des S-100-Gehaltes in Nervenzellen des Hippocampus in Form einer zweiten Fraktion im elektrophoretischen Muster der löslichen Hippocampusproteine.

Eine ganze Reihe von Autoren haben das S-100-Protein in spontanen menschlichen Tumoren, die als Spongioblastome, Astrozytome, Oligodendrogliome, Glioblastome, Medulloblastome und Neurinome klassifiziert wurden, mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese, der Komplementbindungsreaktion und der Immunodiffusion bereits nachgewiesen (BENDA, 1968 a; SLAGEL et al., 1969; HAGLID et al., 1970; HAGLID u. CARLSSON, 1971; STAVROU et al., 1971; PFEIFFER et al., 1972; HAGLID u. STAVROU, 1973). Ferner wurde dieses Protein in experimentellen neurogenen Tumoren der Ratte, d. h. in Astrozytomen, Oligodendrogliomen, gemischten Gliomen und Schwanno-

men gefunden (BENDA, 1968 b; BENDA et al., 1971; STAVROU et al., 1971; PFEIFFER u. WECHSLER, 1972 a, 1972 b; STAVROU u. HAGLID, 1973 b).

Die quantitativen Untersuchungen von HAGLID und STAVROU (1973) an menschlichen neurogenen Tumoren ergaben S-100-Konzentrationen, die in keinem Fall die Werte des normalen Gewebes erreichten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen WECHSLER et al. (1973) bei experimentellen neurogenen Tumoren der Ratte, bei denen der S-100-Gehalt um ein Drittel niedriger war, als in dem entsprechenden normalen Gewebe.

Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen dem S-100-Gehalt und der Malignität der Gliome festgestellt werden. Sowohl bei den menschlichen Glioblastomen (HAGLID u. STAVROU, 1973), als auch bei den MNH-induzierten Gliomen der Ratte (STAVROU et al., 1973) nahm der S-100-Gehalt bei zunehmender Entdifferenzierung ab.

Bei Ependymomen, Meningomen und Sarkomen des Menschen und der Ratte konnte das S-100-Protein nicht nachgewiesen werden (HAGLID u. CARLSSON; STAVROU u. HAGLID, 1973 b).

C. PROBLEMSTELLUNG

Über den histogenetischen Ursprung der experimentell induzierten Hirntumoren des Kaninchens bestehen teilweise noch unterschiedliche Auffassungen, die eine diesbezügliche Untersuchung notwendig machen.

Von SCHREIBER et al. werden bei MNH-induzierten Hirntumoren des Kaninchens neben Glioblastomen auch einige Sarkome beschrieben, die jedoch durch die morphologisch völlig übereinstimmenden Ergebnisse von STAVROU (1969) und KLEIHUES et al. nicht bestätigt werden konnten. Da das S-100-Protein als derzeit bestes Charakteristikum für gliales Gewebe anzusehen ist (STAVROU, 1973), sichert der Nachweis dieses Proteins den neuroektodermalen bzw. glialen Ursprung der experimentellen neurogenen Tumoren des Kaninchens. Dies würde bedeuten, daß es sich bei den mit MNH erzeugten NS-Tumoren des Kaninchens um Blastome handelt, die mit den experimentellen neurogenen Tumoren der Ratte und den spontanen Hirntumoren vergleichbar sind. Das Vorkommen des S-100-Proteins bei experimentellen Hirntumoren des Kaninchens würde außerdem darauf hinweisen, daß die Wirkung des MNH beim Kaninchen ähnlich ist wie bei der Ratte und deshalb nicht speciesspezifisch ist.

Mit der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch den Nachweis des S-100-Proteins zur Klärung der Histogenese der experimentellen Hirntumoren des Kaninchens beizutragen.

Die Hypothese, daß Hirntumoren auch aufgrund eines kleineren oder größeren transformierten Gewebefeldes entstehen können, wird von ZÜLCH (1969) abgelehnt. Demgegenüber stehen die Beobachtungen von THOMAS und KERSTING (1968), JÄNISCH und SCHREIBER (1969), STAVROU (1971) sowie STAVROU und HAGLID (1973 a), die bei experimentellen Gliomen eine gleichzeitige Wucherung aller transformationsfähigen Elemente eines Gebietes beschreiben, ohne daß dabei Wachstums- oder Proliferationszentren wahrgenommen werden können. Ähnliche Beobachtungen liegen auch von ZIMMERMAN (1955) und SCHIEFER (1962) vor, obwohl die von diesen Autoren vorgelegten Befunde mit denen nach Nitrosamid-Cancerisierung nicht vergleichbar

sind.

In einem Teil dieser Arbeit soll anhand von morphologischen Befunden bei MNH-induzierten Hirntumoren des Kaninchens aufgezeigt werden, daß zumindest für bestimmte experimentelle Hirntumoren als formales pathogenetisches Prinzip auch die "Feldtransformation" nach WILLIS möglich ist. Sollte dies auch für spontane Hirntumoren zutreffen, würde es besonders für die Neurochirurgie bedeutsam sein, da in vielen Fällen die Ausdehnung des transformierten Gewebefeldes größer ist, als dies der sichtbare Tumor vermuten lassen würde (WILLIS).

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methodik

1.1. Tierversuche

Als Versuchstiere verwendeten wir 57 3 - 4 Monate alte mischrassige Kaninchen beiderlei Geschlechts, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Sie erhielten Standarddiät Treff^(R) und Wasser ad libitum, außerdem standen Karotten und Rauhfutter zur Verfügung.

Die Tumorinduktion wurde nach den Angaben von JÄNISCH und SCHREIBER (1967) durchgeführt. In 14tägigen Abständen erhielten die Tiere eine MNH-Injektion von 10 mg/kg Körpergewicht in die Ohr- randvene. Die MNH-Lösung wurde mit steriler, pyrogenfreier 0,9 %- iger NaCl-Lösung unter Zusatz von 1 % NaH₂PO₄ hergestellt. Die Konzentration der jeweils frisch angesetzten Lösung (pH 5-6) betrug 10 mg/ml. Die Injektionen wurden solange fortgesetzt, bis die Tiere starben oder in moribundem Zustand mit Narcoren^(R) i.v. getötet werden mußten.

Die mittlere Induktionszeit betrug 273 Tage (164 - 341) bei einer mittleren Gesamtdosis von 685 mg/Tier (270 - 950). Bei 61 % der Tiere entstanden Hirntumoren; sonstige Tumoren traten nicht auf. Die interkurrent verstorbenen Tiere wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

1.2. Histologische Untersuchung

Nach der Sektion wurde das Material für die histologische Untersuchung in 6 %igem neutralen Formol, das 1,5 % NaCl enthielt, fixiert und danach in Paraplast^(R) eingebettet. An Routinefärbungen kamen Hämatoxylin-Eosin- und NISSL-Färbung zur Anwendung. In einigen Fällen wurden die Metallimprägnationen nach WILDER, BODIAN oder GLOBUS durchgeführt.

1.3. Immunologische Untersuchungen

S-100-Protein und Anti-S-100-Immunserum

Das S-100-Protein wurde nach den Angaben von MOORE aus Rinderhirn isoliert. Extraktion, Reinigung und immunologische Identifizierung des S-100-Proteins sind bei HAGLID und STAVROU (1973) beschrieben. Das Anti-S-100-Serum wurde von Kaninchen durch subcutane Grundimmunisierung und anschließende intravenöse Reimmunisierung mit Rinder-S-100-Antigen gewonnen. Nähere Angaben zur Gewinnung des Anti-S-100-Immunserums finden sich bei HAGLID et al. (1973).

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis des S-100-Proteins kamen folgende Methoden zur Anwendung:

1.3.1. Immunodiffusion

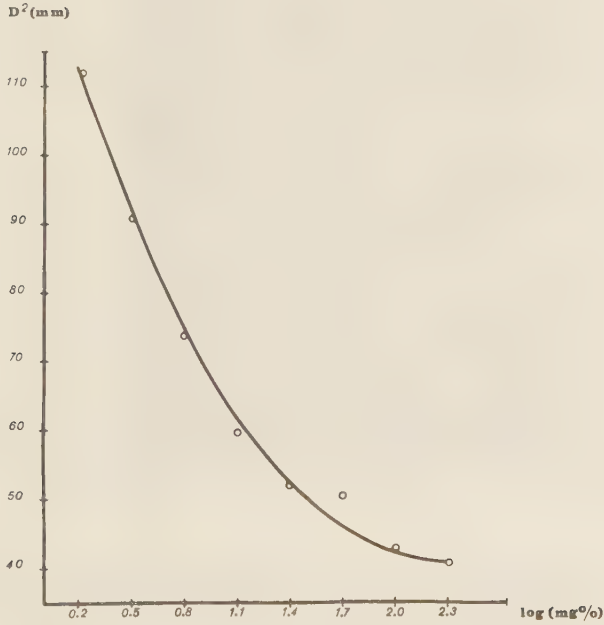
Für die doppelte Immunodiffusion in Agargel nach OUCHTERLONY (1948) werden zunächst die Objektträger mit je 3 ml einer heißen 1 %igen Agargel-Lösung (Special Noble-Agar, DIFCO LABORATORIES/Detroit, USA), die mit NaCl-Barbitalpuffer (pH 7,3 - 7,4; 0,027 M) hergestellt wird, beschichtet und nach dem Erstarren des Agars die Löcher ($\varnothing$ 2,0 mm) ausgestanzt. Die Tumorproben werden nach Zusatz von 5 Volumenanteilen eines Veronal-Salzsäure-Puffers (pH 8,4; 0,04 M) homogenisiert und anschließend 20 min bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird als Antigen verwendet und jeweils 5 µl der Verdünnung 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 in 4 der umgebenden Löcher mit einer HAMILTON-Mikroliterspritze eingefüllt. Eine Normalhirnprobe sowie eine Organprobe bzw. Puffer werden als positive bzw. negative Kontrolle in die beiden übrigen Löcher eingebracht. In das zentrale Loch geben wir 5 µl Anti-S-100-Immunserum (7,5 mg gefriergetrocknetes Antiserum in 0,125 ml Aqua bidestillata) in der Verdünnung von 1 : 5. Um eine stärkere Präzipitation zu erhalten, füllen wir in einigen Fällen alle Löcher zehnmal mit jeweils 5 µl nach. Die Präparate werden 24 h in der feuchten Kammer bei Raum-

temperatur inkubiert.

Danach werden die Agargelplatten 2 - 3 Tage in Veronal-Salzsäure-Puffer (pH 10,0) unter mehrmaligem Wechseln der Pufferflüssigkeit gewaschen, um die nicht präzipitierten Proteine zu entfernen. Die vollständige Austrocknung der Platten erfolgt im Brutschrank bei 37° C, wobei die Gele mit 3 wassergetränkten Filterpapierstreifen abgedeckt sind. Vor dem Färben werden die Präparate gut angefeuchtet und danach 20 min in 0,4 %ige Amidoschwarz-Lösung gelegt. Die Entfärbung nehmen wir mit einem Eisessig-Methanol-Gemisch im Verhältnis von 1 : 9 vor, mit dem auch die Färbelösung hergestellt wird. Abschließend lassen wir die Platten bei Raumtemperatur trocknen.

Zur semiquantitativen Bestimmung des S-100-Gehaltes wird der Tumorextrakt in der Verdünnung 1 : 5 in alle 6 umgebenden Löcher gefüllt. Nach der Präzipitation bzw. nach der Färbung wird der Durchmesser des entstandenen Präzipitatrings mit der Taschenuhr-Schublehre "Dial-Caliper" (Fa. MITUTOYO, Mfg. Co., Ltd.) gemessen und die S-100-Konzentration aus der Eichkurve errechnet.

Um die Eichkurve aufzustellen, gaben wir jeweils gleiche Konzentrationen reines S-100 in die 6 umgebenden Löcher und ließen S-100 und Anti-S-100-Serum im zentralen Loch gegeneinander diffundieren und erhielten einen Präzipitationsring in der Form eines Sechsecks. Mehrere derartige Platten mit S-100-Konzentrationen von 200 bis 1,56 mg% bei gleichbleibender Anti-S-100-Serum-Konzentration wurden angefertigt und die Durchmesser der Präzipitationsringe mit der Schublehre gemessen. Die Werte des Durchmessers wurden quadriert und auf die Ordinate, die entsprechenden Konzentrationswerte in mg/100 ml als Logarithmus auf die Abszisse aufgetragen (Abb. 1). Die Abbildung 2 zeigt, daß bei steigender Antigenkonzentration die Präzipitationsringe kleiner werden; das bedeutet, daß das Antigen schneller durch die Gelschicht diffundiert (OUCHTERLONY, 1962; GROG, 1970).



1

Abb. 1 Eichkurve zur semiquantitativen Bestimmung des S-100-Proteins mittels der doppelten Immunodiffusion. Der Logarithmus der Antigenkonzentration ist auf die Abszisse, der quadrierte Wert der Präzipitatringdurchmesser auf die Ordinate eingetragen.

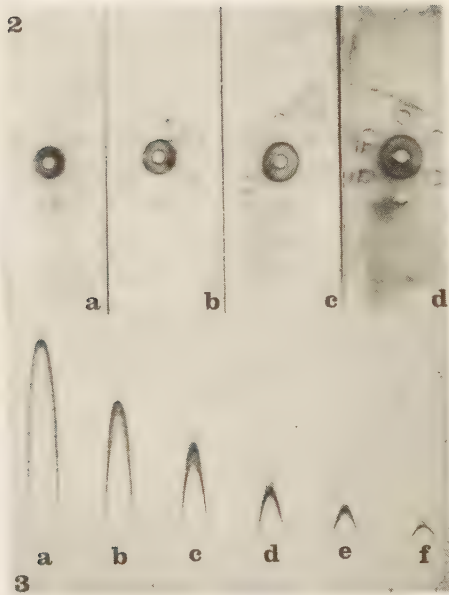


Abb. 2 Semiquantitative Immunodiffusion zur Anfertigung der Eichkurve: gleiche Konzentration des Anti-S-100-Serums in den zentralen Löchern, jeweils gleiche Konzentration reines S-100-Protein (a-100; b-50; c-25; d-12,5 mg%) in den 6 umgebenden Löchern.

Abb. 3 Quantitative Immunelektrophorese zur Erstellung der Eichkurve: Die 1 %ige Agarose enthält 0,4 % Anti-S-100-Serum; jeweils 10 μ l reine S-100-Protein-Lösung wurde in die Löcher (a-f) in abnehmenden Konzentrationen (800, 400, 200, 100, 50, 25 ng/10 μ l) eingefüllt.

1.3.2. Quantitative Immunelektrophorese

Für die quantitative Immunelektrophorese nach den Angaben von LAURELL (1966) wird 1 %ige Litex-Agarose (LITEX, Glostrup/Denmark; Batch No.: AGS 105 AX) als Trägermaterial verwendet. Die Agarose-Lösung wird mit Barbitol-Puffer (pH 8,6; 0,02 M) hergestellt unter Zusatz von 1 % Polyäthylenglykol (MG 6000) zur Verstärkung der Präzipitation. Dieser Lösung setzen wir im Wasserbad bei 58° C das Antiserum in einer Konzentration von 0,4 % zu und verwenden für die Beschichtung der 76 x 52 mm großen Objektträger jeweils 7,5 ml.

Aus den zu untersuchenden Proben wird mit 5 Volumenanteilen Aqua bidestillata (pH 7,1), das 2,5 mM EDTA und 0,1 mM 2-Mercapto-äthanol enthält, mit dem Glashomogenisator "Potter S" (Fa. BRAUN/Melsungen) bei 0° C ein Homogenat hergestellt, welches anschließend für 48 h bei 4° C in Aqua bidestillata (pH 7,1) unter mehrmaligem Wechseln des Wassers dialysiert wird. Die Dialyseschläuche werden vorher 10 min lang in einer 2,5 mM EDTA-Lösung gekocht und dreimal in kochendem Aqua bidestillata gewaschen. Das Homogenat wird dann in der Ultrazentrifuge (Beckman^(R), Spinco L-2) 60 min lang bei 105 000 g und 4° C zentrifugiert.

Die Bestimmung des löslichen Proteins erfolgt in den Homogenaten vor der Dialyse nach der Methode von LOWRY et al. (1951).

Aus dem Überstand sowie aus in Aqua bidestillata gelöstem reinem S-100 wird mit Barbitol-Puffer (pH 8,6) die Antigenverdünnungsreihe hergestellt und davon jeweils 10 µl mit einer HAMILTON-Mikroliter-spritze in die ausgestanzten Agarose-Löcher (2,5 mm Ø) eingefüllt. Neben den Tumorproben laufen jeweils eine Referenzprobe mit bekanntem S-100-Gehalt, eine Organprobe und adsorbiertes S-100 als Kontrollen mit.

Die Elektrophorese erfolgt in der Apparatur "Mikrophor" mit "Frigo-phor" (Fa. BOSKAMP Gerätebau KG/Hersel) während einer Laufzeit von 5 h bei 1 mA/cm und 10 - 15° C. Als Kammerpuffer dient ebenfalls Barbitol-Puffer (pH 8,6).

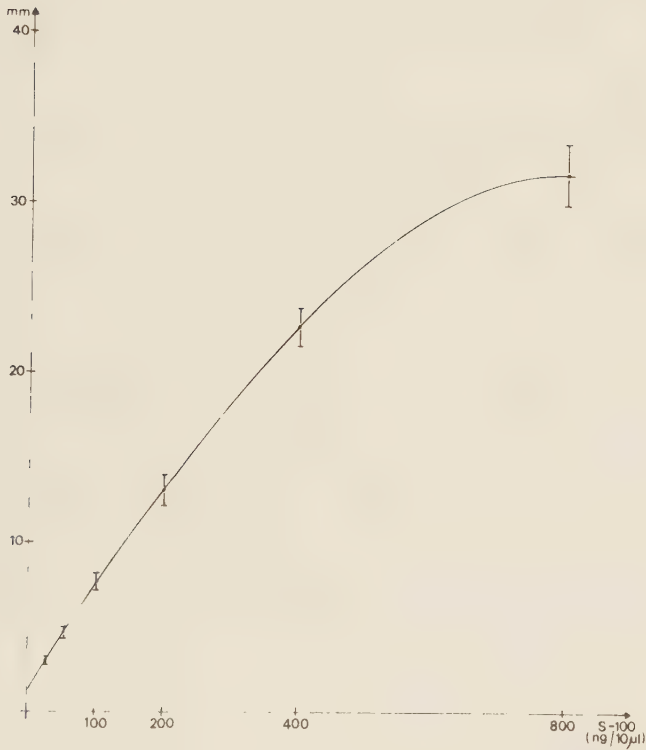
Nach beendeter Elektrophorese werden die nicht präzipitierten Proteine entfernt, indem die Objektträger mit 3 feuchten Filterpapierstreifen, einer 2 cm dicken feuchten Zellstoffschicht und einer Glasplatte bedeckt und mit einem Gewicht von ca. 1 kg 20 min lang belastet werden. Danach werden die Präparate jeweils 10 min in 0,9 %iger NaCl-Lösung und Aqua bidestillata gewaschen und schließlich bei 37° C im Brutschrank unter 3 feuchten Filterpapierstreifen getrocknet. Die Färbung erfolgt mit 0,5 %iger Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung während 3 min und die Entfärbung mit einem Eisessig-Methanol-Wasser-Gemisch (1 : 2,5 : 4,5), mit dem auch die Färbelösung hergestellt wird (Abb. 3)

Um den S-100-Gehalt der Proben zu errechnen, wird die Höhe der Präzipitatpeaks, die der Antigenmenge - sofern diese in einem definierten Lösungsmittelvolumen eingebracht wird - direkt proportional ist, mit einer Schublehre gemessen und die dazugehörige S-100-Konzentration in der Eichkurve abgelesen. Diese Eichkurve wurde aufgrund mehrerer Verdünnungsreihen erstellt, wobei reines S-100 in bekannter Konzentration als Antigen diente; die daraus resultierenden Mittelwerte wurden mit ihren Standardabweichungen auf die Ordinate, der dazugehörige S-100-Gehalt in ng/10 µl auf die Abszisse aufgetragen (Abb. 4).

1.3.3. Komplementbindungsreaktion

Der quantitative Nachweis des S-100-Proteins mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion erfolgt in Anlehnung an die Angaben von KABAT und MAYER (1961) sowie von MOORE und PEREZ (1966). Die methodischen Einzelheiten dieser Technik finden sich bei HAGLID et al. (1973)⁺.

+ Für die Durchführung der Komplementbindungsreaktion bin ich Herrn Doz. Dr. K.G. Haglid, Institute of Neurobiology, University of Göteborg/Sweden zu Dank verpflichtet.



4

Abb. 4 Eichkurve zur quantitativen Bestimmung des S-100-Proteins mittels der Immunelektrophorese. Die Antigenkonzentration ist auf die Abszisse, die Präzipitathöhe auf die Ordinate eingetragen.

1.3.4. Immunofluoreszenz

Der zytologische Nachweis des S-100-Proteins in den Hirntumoren des Kaninchens durch die Immunofluoreszenztechnik erfolgt in Anlehnung an die indirekte Färbemethode (Sandwich-Technik) von COONS (1957). 6 μ dicke Gefrierschnitte, die 60 min bei Raumtemperatur getrocknet sind, werden 30 sec in kaltem (+ 4° C) Aceton fixiert und 5 min luftgetrocknet. Anschließend werden die Objektträger 5 min in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS-Puffer) mit einem pH von 7,1 gewaschen. Nachdem die Schnitte wieder getrocknet sind, werden sie 30 min mit unverdünntem Anti-S-100-Serum bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Antiserums, mehrmaligem Waschen (3 x 5 min) in PBS-Puffer und erneutem Trocknen, erfolgt die Markierung des S-100/Anti-S-100-Komplexes durch 30 min langes Inkubieren mit Fluorescein-Isothiocyanat-markiertem Schaf-Anti-Kaninchen-Globulin (FLOW-LABORATORIES, Scotland). Der Überschuß wird dann entfernt und die Schnitte wieder 3 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt. Als Kontrolle dienen sowohl Schnitte, die mit adsorbiertem S-100-Serum als auch Präparate, die mit normalem Kaninchenserum inkubiert werden. Lichtquelle: Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 200 W), Erregerfilter: KB 500 (LEITZ-Interferenzfilter) - BG 38 (LEITZ); Sperrfilter: K 510 (LEITZ).

2. Ergebnisse

Über die Anzahl der beim Kaninchen experimentell induzierten neurogenen Tumoren sowie deren Klasifikation gibt die Tabelle 1 Aufschluß.

2.1. Morphologie

2.1.1. Makroskopische Befunde

Die Hirntumoren des Kaninchens zeigen bei der makroskopischen Betrachtung eine grauweiße bis graurosa Färbung, nur vereinzelt geht

Tabelle 1: Übersichtliche Darstellung der beim Kaninchen postnatal durch wiederholte Applikation von MNH experimentell induzierten neurogenen Tumoren.

Tumortyp	Anzahl	%
I. Gliome		
1. Oligodendrogliome (I, II)	14 (I = 5; II = 9)	33,4
2. Astrozytome (I, II)	9 (I = 3; II = 6)	21,4
3. Primär heteromorphe Gliome	9	21,4
4. Pleomorphe Gliome	4	9,5
II. Ependymome	5	11,9
III. Unklassifiziert	1	2,4
Total	42	100,0

der Farbton ins gelbliche oder dunkelgraue über. Sie sind meist von weicher oder auch zerfließlicher Konsistenz und erscheinen auf der Schnittfläche speckig bis glasig und zuweilen feucht. Bei einigen, meist umfangreichen Geschwülsten sind in deren Zentrum Nekrosen zu erkennen, wobei der Farbton mehr gelblich und die Schnittfläche grieselig ist. Der gesamte Tumor kann außerdem von Blutungen unterschiedlicher Ausdehnung (Abb. 5 a) durchsetzt sein. Die Hämorrhagien sind jedoch meist auf die Peripherie beschränkt, während im Tumorzentrum oft Cysten mit rötlich-wäßrigem oder schleimigem Inhalt vorhanden sind. In der Regel sind sie nur unscharf begrenzt, so daß der Übergang zum normalen Hirngewebe fließend ist (Abb. 5 a, b).

Bei Lokalisationen in der Rinde erheben sich die Blastome mehr oder weniger über das Niveau der Hirnoberfläche, während es bei größeren Tumoren, die mehr in den tiefen Hirnpartien liegen, zu Massenverschiebungen und bereits äußerlich sichtbarer Hirnasymmetrie kommen kann. Als Prädilektionsstellen sind die subependymären Zonen der Seitenventrikel, der Hippocampus, der Lobus piriformis und der Lobus occipitalis sowie das Stammhirn zu nennen (Abb. 5 a-d u. 6).

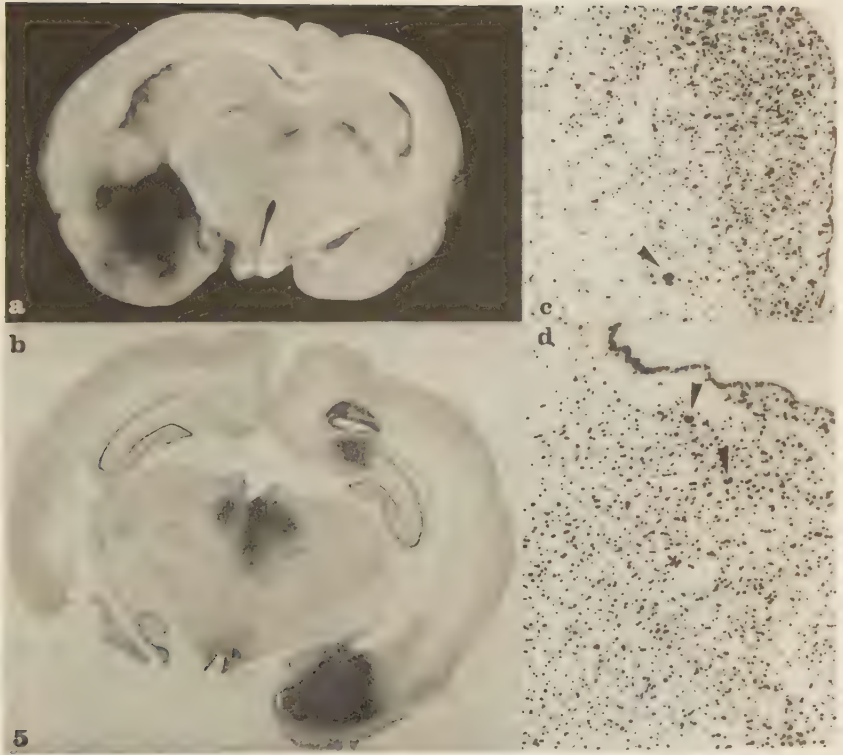
2.1.2. Histologische Befunde

I. Gliome

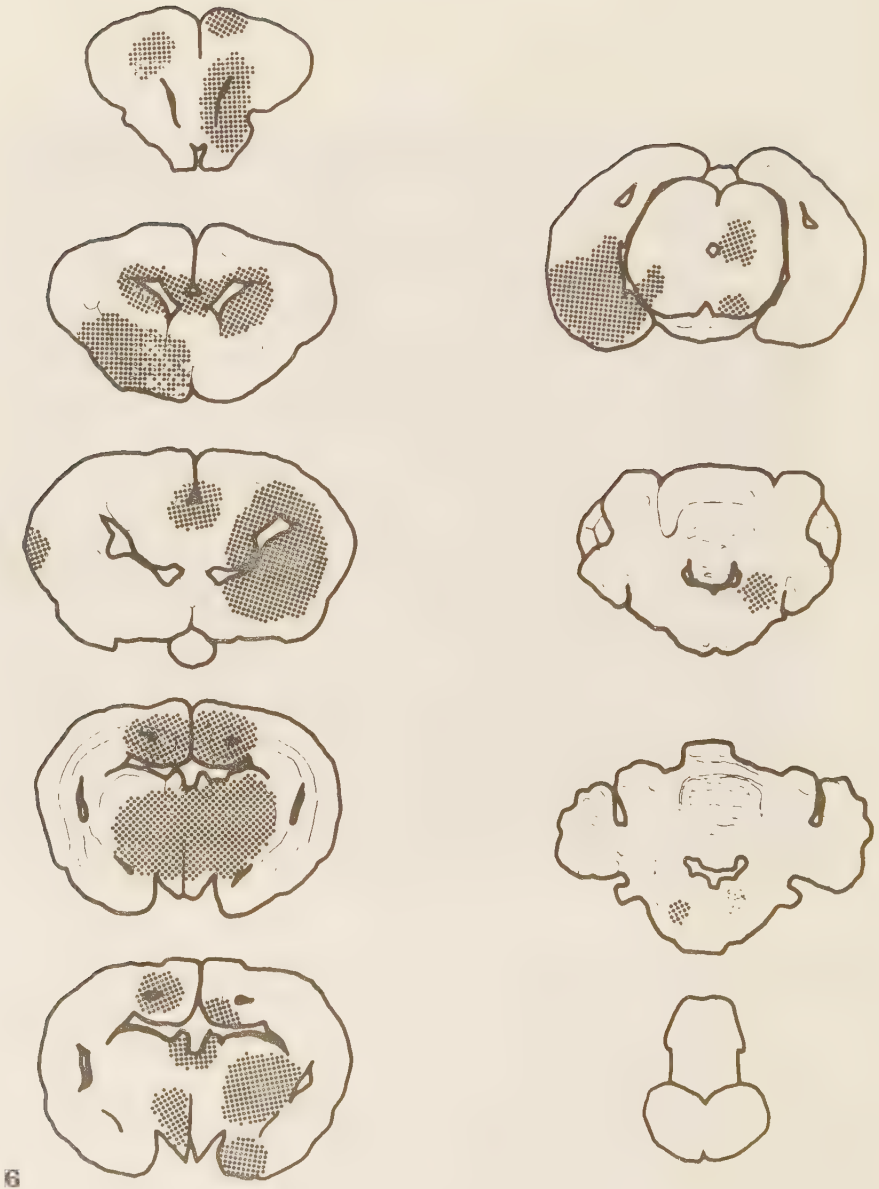
1. Oligodendrogliome (Grad I u. II)

Die Tumoren dieser Gruppe sind hauptsächlich in der weißen Substanz, meist in den paraventrikulären Regionen der Seitenventrikel, sowie in deren Nachbarschaft, vereinzelt aber auch im Hirnstamm lokalisiert.

Die Oligodendrogliome I sind in der Regel sehr zellreich und bestehen aus relativ isomorphen und gleichmäßig gelagerten, zytoplasmaarmen Zellen, die einen kleinen, runden, chromatinreichen Kern aufweisen und somit an Lymphoidzellen erinnern (Abb. 7a). Die Tumorzellen haben die Neigung zur Anordnung in parallelen Reihen, in Bändern entlang der Gefäße und lagern sich in der vom Tumorgewebe durchsetzten grauen Substanz meist zu mehreren um präexistente, oft noch gut erhaltene Ganglienzellen (Satellitose). Bei der Reihenanordnung erhalten die Zellkerne durch die hirneigenen Faserstrukturen eine mehr langgestreckte Gestalt. Als besonderes Merkmal dieser Gruppe ist die in der Regel deutliche Honigwabebildung zu nennen, wobei die Zellkerne im Zentrum der durch Vakuolisierung des Zytoplasmas entstandenen Hohlräume liegen (Abb. 7 a). Die Vaskularisierung unterscheidet sich bei dieser Malignitätsstufe nur geringfügig von der des normalen Hirns, und Mitosen liegen nur wenige vor. Der Übergang zum Grad II, wozu die Mehrzahl der Oligodendrogliome gehört, ist fließend und durch zunehmende Pleomorphie gekennzeichnet.



- Abb. 5a Im Bereich des Lobus piriformis gelegener Tumor, der zu deutlicher Hirnasymmetrie geführt hat.
- b Primär multizentrisch entstandene Tumoren im periventrikulären Bereich.
- c - d Verschiedene Stadien subependymärer Mischgliome mit riesenzellartigen Bildungen (►).
(NISSL-Färbung 48 x)



6

Abb. 6 Schematisierte Darstellung der Prädilektionsstellen experimenteller Hirntumoren des Kaninchens.

Die Zellkerne werden vielgestaltiger, man findet auch größere und zugleich chromatinärmere Kerne. Die Mitoserate ist teilweise sehr hoch, hyperchromatische Zellkernkonglomerate und Riesenzellen sind oft in großer Zahl anzutreffen (Abb. 7 c). Die Gefäßversorgung mit Kapillaren und einzelnen größeren Gefäßen ist reichlich. Häufig fällt die Bildung von ausgeprägten Gefäßgirlanden und glomerulumartigen Kapillarschlingen in den Tumorrandzonen auf. Dabei sind die Gefäßwände teilweise hyalinisiert, und es zeigen sich einzelne Hämorrhagien. Daneben findet man in den peripheren Tumorpartien und insbesondere in der Tumornachbarschaft häufig eine mehr oder weniger stark ausgeprägte perivaskuläre Infiltration von lymphoplasmozytären Elementen. Die regressiven Vorgänge, die in landkartenartigen Nekrosen im Tumorzentrum sowie einer Tendenz zu Verschleimung mit Cystenbildung bestehen (Abb. 7 b), vervollständigen das Bild dieser Gruppe. Bei einem Oligodendrogliom II wurde eine für diese Gliome typische subpiale Ausbreitung mit örtlichen Einbrüchen in den Subarachnoidalraum beobachtet. Einige Fälle mit ausgeprägter Pleomorphie der Tumorzellen, zahlreichen Mitosen sowie Monsterzellbildungen und umfangreichen regressiven Veränderungen veranschaulichen den Übergang zur Gruppe der pleomorphen Gliome.

2. Astrozytome (Grad I und II)

Zahlenmäßig weniger stark vertreten ist die Gruppe der Astrozytome. Auch sie sind oft im subependymären Glialager der Seitenventrikel zu finden, jedoch häufiger als die Oligodendrogliome im Bereich des Cortex und des Stammhirns anzutreffen.

Die Astrozytome sind insgesamt weniger zellreich als die Oligodendrogliome. Die Zellkerne sind klein bis mittelgroß, haben ovale oder bohnen- und nierenförmige Gestalt und ein Chromatinnetz von mittlerer Dichte. Die meist zytoplasmaarmen Zellen besitzen sternförmige Zytoplasmaausläufer und sind nicht immer gleichmäßig verteilt, sondern liegen gerne in Grüppchen zusammen. Der Grad I zeichnet sich durch isomorphe Zellen, nur vereinzelte Mitosen und eine geringfügige Kapillarisierung aus (Abb. 8a - c).

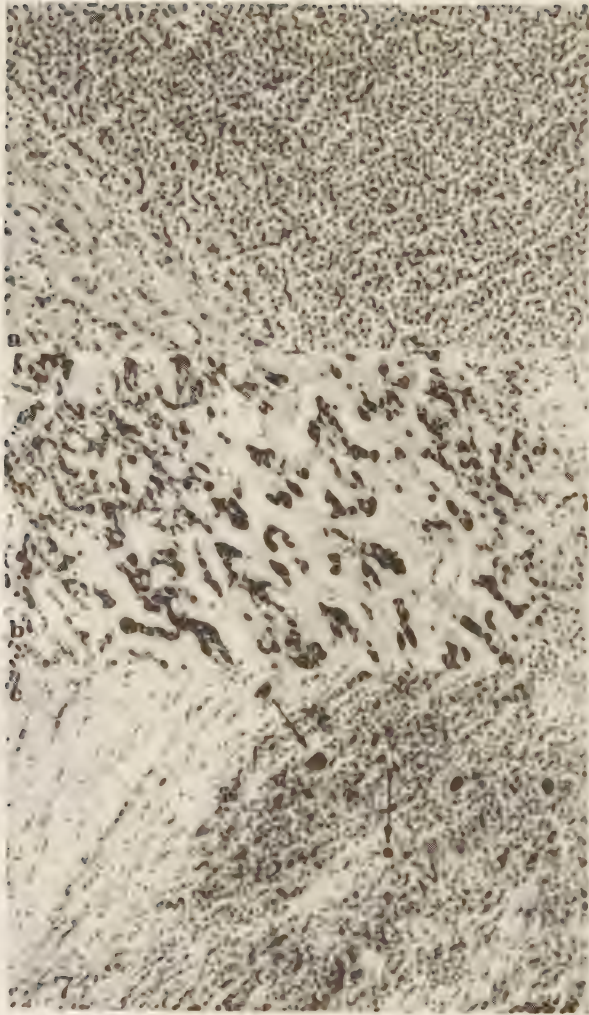


Abb. 7 Oligodendrogliome: Oligodendrogliom I mit deutlicher Reihenanordnung der Tumorzellen (a) und Verschleimungs-
zonen (b); Oligodendrogliom II mit flusszellähnlichen Ge-
bilden (—>) und deutlicher Pleomorphie (c). (a HE-
Färbung 48 x; b, c NISSL-Färbung 48 x)

Mit zunehmender Entdifferenzierung werden die Zellkerne größer und weisen nur noch einen geringen Chromatingehalt auf; nicht selten findet man monströse mehrkernige Astrozyten (Abb. 8d). Beim Grad II sind außer der beginnenden Pleomorphie der Tumorzellen sehr viele Mitosen und zahlreiche Riesenzellen zu verzeichnen. In den Arealen mit Erweichung des Tumorgewebes und meist gleichzeitiger Cystenbildung wird deutlich, daß die Tumorzellkerne im Kreuzungspunkt des Fasernetzes liegen. Verschleimungszone und Gebiete mit ausgedehnten straßenartigen Nekrosen liegen im Tumorzentrum nebeneinander. Am Rande der Nekrosen formieren sich die Tumorzellen oft in Pseudopalisadenstellung. Um die reichlich vorhandenen Gefäße verschiedenen Kalibers häufen sich die Geschwulstzellen mitunter sternförmig an. Viele Gefäßwände zeigen eine Endothelschwellung bzw. hyaline Verquellung der ganzen Gefäßwand, wobei es an einigen Stellen zu einer Blutung kommt. In den Tumorrandgebieten sieht man perivaskuläre lymphoidzellige Infiltrationen und einige Gefäßgirlanden. Das Wachstum scheint rasch vor sich zu gehen, da sich im Tumorgewebe oft noch gut erhaltene ortsständige Oligodendrozyten und Ganglienzellen finden.

Ein frontal im Bereich der Mantelkante gelegener Tumor, der ebenfalls als Astrozytom klassifiziert wurde, weicht jedoch wesentlich von den oben beschriebenen Fällen ab. Die Kerne seiner teilweise pleomorphen Zellen sind parallel in Reihen angeordnet und haben größtenteils eine langgestreckte pilocytische Form. Diese bipolaren Geschwulstzellen formieren sich in fischzugartigen Zügen und Strudeln mit Wirbelbildung und sind zur Meninx hin dichter gelagert. Die zentralen Partien weisen mehrere kleine Nekrosen auf. Die Vaskularisierung ist mäßig, wobei die Tumorzellen sternförmig um die Gefäße angeordnet sind. Um einzelne Gefäße in der Peripherie zeigt sich eine Infiltration von Lymphoidzellen.

Die Gestalt der Zellen und der Zellkerne sowie die Architektur lassen differentialdiagnostisch auch an ein Spongioblastom denken, doch sind zahlreiche Mitosen vorhanden, ein Zusammenhang mit dem Ventrikelsystem fehlt und ROSENTHALsche Fasern werden nicht gefunden.

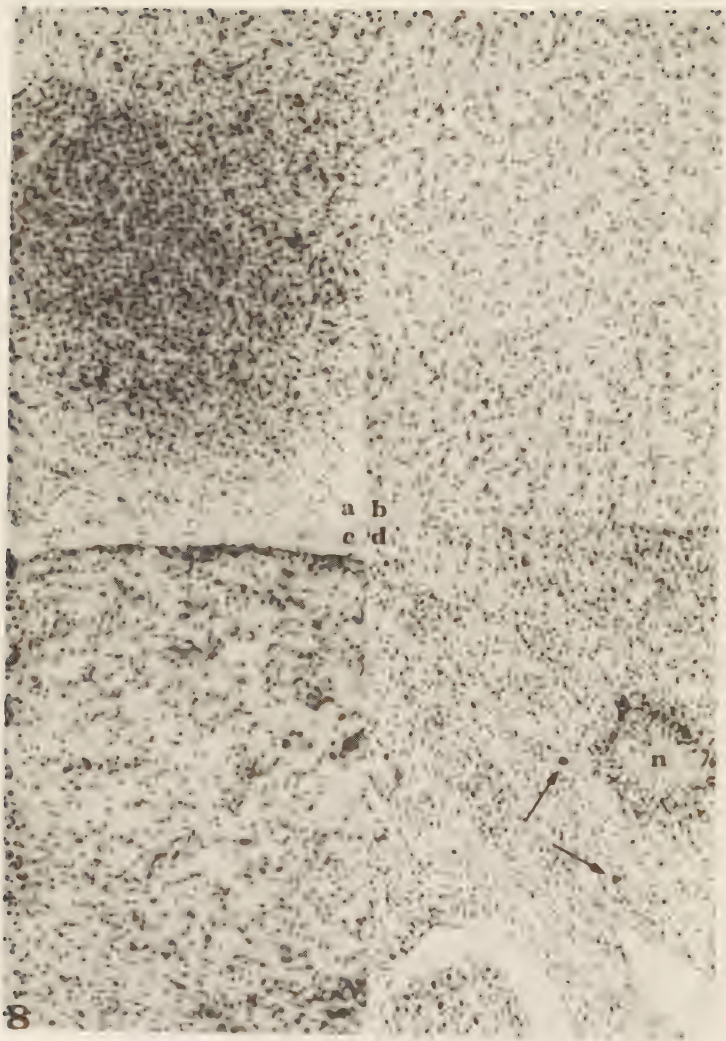


Abb. 8

Astrozytome: aus astrozytären Elementen bestehender "Mikrotumor" (a); Astrozytom I mit gleichmäßiger Lagerung der Tumorzellen und nur vereinzelten Mitosen (b); Astrozytom I - II, dessen Zellkerne im Kreuzungspunkt des Fasernetzes liegen (c); Astrozytom II (d) mit vielen Mitosen, riesenzellähnlichen Bildungen (→) und Nekrosen (n). (NISSL-Färbung 48x)

3. Primär heteromorphe Gliome

Die Lokalisationen der häufig auftretenden Mischgliome sind relativ gleichmäßig über das Gehirn verteilt. Man findet sie vom Hemisphären-cortex bis zu den subependymären Regionen und dem Hirnstamm einerseits und vom Frontalhirn bis zum Corpus medullare des Kleinhirns und zur Medulla oblongata andererseits.

Bei den Mischgliomen handelt es sich um Tumoren mit mittlerem bis großem Zellreichtum, wobei oft eine sehr heterogene Zellpopulation am Tumorgeschehen beteiligt ist. Der variierende Anteil der verschiedenen Gliaarten liegt entweder als Gemisch vor, oder aber es wechseln sich Areale mit vorwiegender Beteiligung eines Gliatyps miteinander ab. Dabei kommt es zur Ausbildung von charakteristischen Architekturen, wie z. B. oligodendrogliomartige Honigwaben, ependymomartige Strahlenkronen und Rosetten oder spongioblastomartige Züge und Strudel. Die Mischgliome zeichnen sich durch eine oftmals deutliche Pleomorphie, viele Mitosen und Riesenzellen sowie durch einen mehr oder weniger großen Gefäßreichtum aus. In den peripheren Tumorpartien findet man reichliche Gefäßgirlanden, wobei eine Endothelproliferation mit vielen Mitosen auffällt. Außerdem sind hyaline Verquellung der Gefäßwände, Thrombosierung kleinerer und einiger großer lakunärer Gefäße, Blutungen sowie perivaskuläre Infiltrate von Lymphoidzellen häufig zu beobachten. Die Tumoren werden von teilweise ausgedehnten landkartenartigen Nekrosen durchzogen, das Gewebe kann ferner durch Verschleimung mit cystischer Umwandlung entartet sein, außerdem sind Verkalkungsherde nicht selten anzutreffen.

Zur Meninxbarriere hin konnte in einem Fall eine subpiale Verdichtungszone festgestellt werden, wobei diese Schranke an einigen Stellen durch fingerförmiges Vorwachsen durchbrochen wird.

4. Pleomorphe Gliome

Die pleomorphen Gliome können entweder durch fortschreitende Entdifferenzierung aus primär isomorphen bzw. heteromorphen Gliomen

entstanden sein und stellen so die letzte Stufe einer Entwicklungsreihe dar, oder aber sie werden bereits als primär pleomorphe Gliome angelegt (STAVROU, 1971). Im Vordergrund ihres Erscheinungsbildes stehen immer die ausgeprägten progressiven und regressiven Veränderungen, sie wachsen stets infiltrativ und destruierend.

In den peripher gelegenen Arealen sind die pleomorphen Gliome sehr zellreich, in den zentralen Gebieten jedoch durch nekrotische und andere regressive Vorgänge ausgesprochen zellarm. Die Zellen zeichnen sich durch eine ausgeprägte Pleomorphie aus. Ihre Kerne sind oft groß und chromatinarm. Eine Zuordnung dieser pleomorphen Zellen zu einem bestimmten Gliotyp ist mit histologischen Techniken oft nur schwer oder überhaupt nicht möglich. Die Kern-Plasma-Relation ist häufig verändert; man findet Partien, die nur aus Riesenzellen bzw. mehrkernigen oder großleibigen Monsterzellen bestehen (Abb. 9). Die Tumoren fallen außerdem durch ihren großen Gefäßreichtum auf. Im Zentrum sind zwar meist nur einige Kapillaren vorhanden, in den peripheren Abschnitten sieht man jedoch eine ganze Anzahl großkalibriger, auch kavernöser Gefäße. Die kleineren bilden glomerulumartige Gefäßknäuel oder ausgeprägte Gefäßgirlanden (Abb. 9c). Thrombosen vor allem in großen Gefäßen, Hyalinisierung und Verquellung der Gefäßwände mit Verschluß der Gefäßlumina und intravitale Blutungen sind immer anzutreffen, ebenso wie die perivaskulären lymphoidzelligen Infiltrate (Abb. 10). Die ausgedehnten flächenhaften Nekrosen, die das gesamte Geschwulstgewebe durchziehen, beherrschen das Bild. An ihrem Rand liegen hyperchromatische, pyknotische Kerne, die sich in Pseudopalisadenstellung formieren. Dazwischen finden sich umfangreiche Verschleimungszonen mit Ausbildung von kleinen und größeren Cysten; in einigen Abschnitten ist das Tumorgewebe nur noch sehr locker gelagert. Die Ablagerung von einzelnen freien Kalkschollen und die Verkalkung von Gefäßwänden vervollständigen das Bild. Bei den sekundär pleomorphen Gliomen sind in den Tumorrandgebieten manchmal noch umschriebene Bezirke mit oligodendrogliom-, astrozytom- oder mischgliomartigem Charakter zu erkennen.

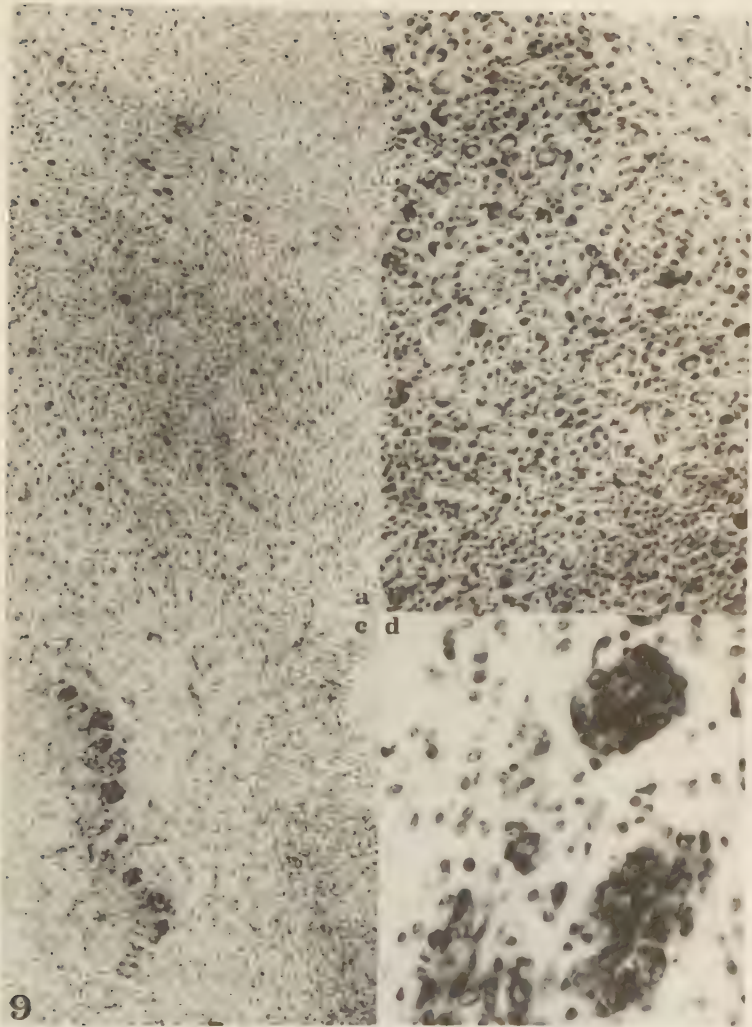


Abb. 9

Pleomorphe Gliome: Feldtransformation mit ausgeprägter Pleomorphie und vielen Riesenzellen (a); primär pleomorphes Gliom mit mehrkernigen Riesen- und Monsterzellen (b); Gefäßgirlanden (c) bzw. intensive Gefäßproliferation (d) bei einem pleomorphen Mischgliom. (NISSL-Färbung a, c 48 x; b, d 150 x)

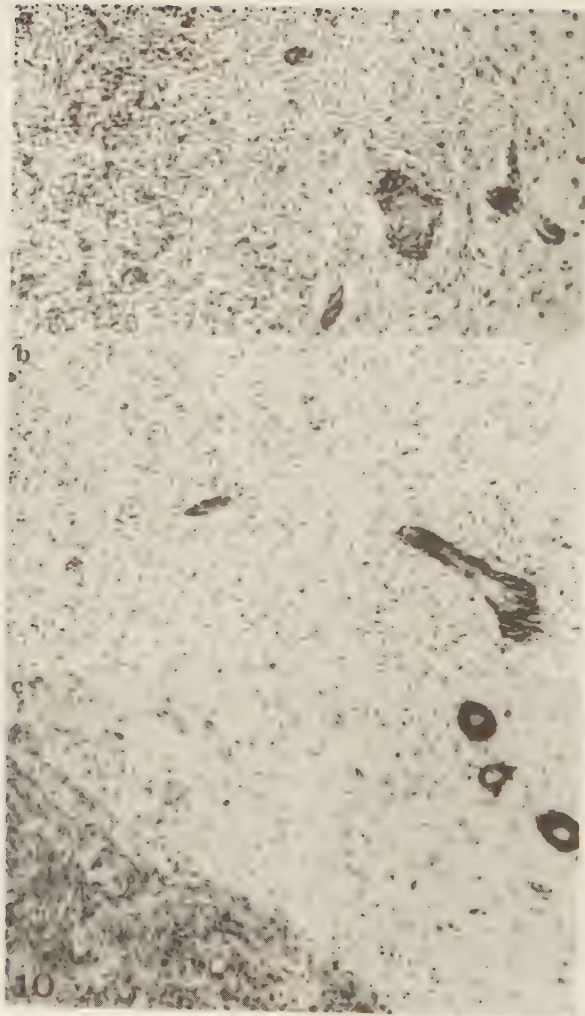


Abb. 10 Perivaskuläre Infiltration von lymphoplasmozytären Zellen in der Randzone eines Oligodendroglioms (a), eines Astrozytoms (b) und eines primär pleomorphen Glioms (c). (a HE-Färbung 48 x; b, c NISSL-Färbung 48 bzw. 120 x)

II. Ependymome

Die Gruppe der Ependymome umfaßt 5 Vertreter. Sie gehen vom Ependym oft beider Seitenventrikel sowie des 3. Ventrikels aus, sind dementsprechend ventrikelnah gelegen und erreichen häufig eine große Ausdehnung. Bereits makroskopisch ist der große Gefäßreichtum und die Neigung zu Hämorrhagien zu erkennen.

Die sehr zellreichen Ependymome sind aus relativ isomorphen zytoplasmaarmen Zellen mit charakteristischem Aussehen aufgebaut. Ihre mittelgroßen Zellkerne sind chromatinreich und von polygonaler Gestalt; das Zytoplasma verhält sich eosinophil. Die epithelartige Aneinanderreihung der Zellen führt zur Ausbildung von Reihen und Bändern. Die charakteristischen Architekturen der Ependymome sind bei einigen Tumoren deutlich ausgeprägt. Bei manchen, dabei zugleich weniger zellreichen, Geschwülsten aber nur angedeutet, weshalb diese als atypische Ependymome zu bezeichnen wären (STAVROU, 1969). Ihre Zellen sind auch mehr oval bis länglich; ihr schmaler Zytoplasmasaum endet in meist einem, manchmal auch mehreren spitzen oder kolbig-plumpen Ausläufern.

An typischen Ependymomstrukturen findet man neben der bereits erwähnten Reihenanordnung auch die Lagerung der Geschwulstzellen um einen virtuellen Mittelpunkt (Pseudorosetten) oder um einen Hohlraum (echte Rosetten); ferner die radiäre Anordnung um ein Gefäß, an dessen Wand die Zellen durch feine Fortsätze, die sog. Gefäßfüßchen inserieren (Strahlenkronen) und dabei um das Gefäß einen kernfreien Hof entstehen lassen (Abb. 11). Durch zellreiche Abschnitte, die sich um ein größeres Gefäß gruppieren und dazwischenliegende zellärmere Partien mit chromatinarmen geblähten Zellkernen erhält der Tumor ein geschecktes Aussehen. Das umfangreiche Gefäßnetz durchzieht das gesamte Geschwulstgewebe, die Gefäßwände sind oft regressiv verändert. Perivaskuläre lymphoidzellige Infiltrate sind in den Tumorrandzonen anzutreffen. Außer einzelnen kleinen Nekrosen findet man ganze nekrotische Areale, wobei sich dann in deren Umgebung umfangreiche Gefäßverschlüsse und Hämorrhagien zeigen. Freie Kalkniederschläge und verkalkte Gefäße sind immer nachweisbar. Ab-

schnittsweise kommt es durch Verschleimung mit Vakuolenbildung zu oligodendrogliomartigen Honigwabenstrukturen. Die Mitoserate ist recht unterschiedlich, in Einzelfällen sogar sehr hoch. Durch Zusammenlagerung von mehreren Zellen entstehen einzelne riesenzellähnliche Gebilde. Manchmal sind im Tumorgewebe ortsständige Ganglienzellen noch zu erkennen.

III. Unklassifiziert

In unserem Tumormaterial befindet sich ein Blastom, das nicht klassifiziert werden konnte (Abb. 12). Dieser Tumor ist im Bereich der grauen Substanz des Großhirns im subcorticalen Marklager lokalisiert.

Vom normalen Hirngewebe grenzt sich der zellreiche Tumor nicht scharf ab. Die kleinen mit einem dichten Chromatinnetz ausgestatteten Zellkerne weisen eine unregelmäßig eckige Gestalt auf, oft sind sie länglich bis stäbchenförmig. Die zytoplasmaarmen Zellen besitzen gewundene und sich mehrfach aufspaltende Fortsätze; viele Zellen erhalten durch einen exzentrisch liegenden Kern und das schmale, sich nach einer Seite verjüngende Zytoplasma ein kaulquappenähnliches Aussehen. Die Tumorzellen sind nicht ganz gleichmäßig verteilt, um die Kapillaren und um präexistente Ganglienzellen sind sie gruppenweise gelagert. Die geringe Vaskularisierung besteht in einer Vermehrung von Kapillaren. Mitosen sind mehrere vorhanden, Nekrosen können dagegen keine gefunden werden. Im gesamten Tumoreal kann eine Neigung zur Bildung kleiner Vakuolen beobachtet werden, wobei die Zellkerne nicht im Zentrum dieser Hohlräume liegen.

IV. "Mikrotumoren"

Bei der histologischen Untersuchung konnte neben den bereits makroskopisch sichtbaren Tumoren eine ganze Anzahl von "Mikrotumoren" festgestellt werden. Diese liegen größtenteils in der subependymären bzw. subcorticalen weißen Substanz; man kann sie aber auch in ande-

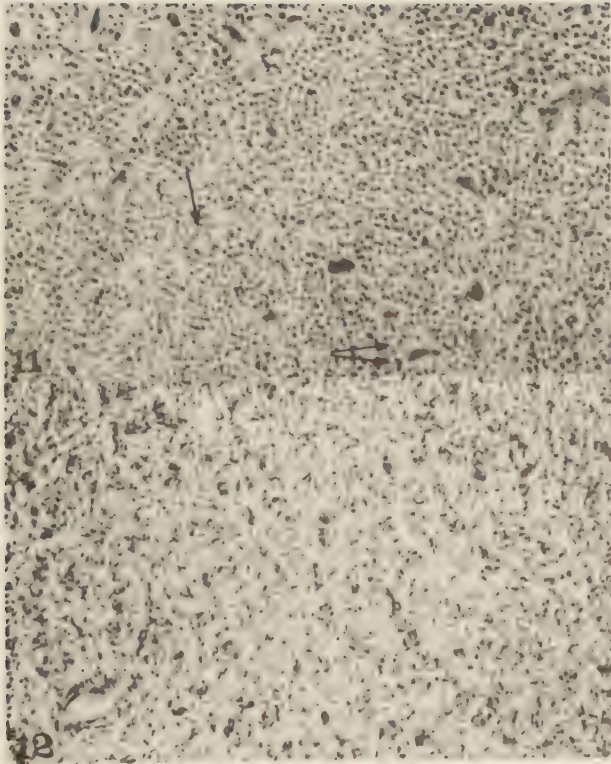


Abb. 11 Ependymom mit typischen Strahlenkronen- (→) und Rosettenbildungen (⇔). (HE-Färbung 120 x)

Abb. 12 Aus stäbchenförmigen und zytoplasmaarmen Zellen mit chromatinreichem Kern aufgebauter nicht näher klassifizierter Tumor. (NISSL-Färbung 150 x)

ren Bereichen des Hirns einschließlich des Kleinhirns antreffen. Sie sind meist multilokulär angelegt und aus verschiedenen Gliatypen aufgebaut (Abb. 5).

Sehr häufig sind umschriebene Oligodendroglia proliferationen zu finden, die aus einer kleinen Ansammlung von isomorphen Zellelementen bestehen und nur einzelne Mitosen aufweisen. Haben diese Herde dann eine oft nur geringfügig größere Zellzahl und Ausdehnung erreicht, fallen die höhere Mitoserate und die beginnenden, aber deutlichen Kernunregelmäßigkeiten auf, und sie lassen bereits eine typische Honigwabenbildung und Satellitose erkennen. Meist sind dann auch mehrkernige Monsterzellen, einzelne Riesenzellen sowie eine Gefäßvermehrung vorhanden.

Diese umschriebenen Zellwucherungen können auch aus Astrozyten (Abb. 8a) oder aus Oligodendrozyten und Astrozyten zusammengesetzt sein. Auch hier sieht man bei den kleineren Zellansammlungen mehr isomorphe Zellen mit nur wenigen Mitosen und Kernatypien, während die nur wenig größeren Proliferationen bereits eine wesentlich höhere Mitoserate und einzelne Riesenzellen sowie eine stärkere Gefäßbeteiligung als das normale Gewebe aufweisen.

Daneben gibt es aber auch kleinste Herde mit so ausgeprägter Pleomorphie, daß eine Zuordnung zu einem bestimmten Gliatyp nach zytologischen Kriterien kaum möglich ist. Sie sind reich an großen hyperchromatischen und aufgeblähten chromatinarmen Riesenkernen sowie an Mitosen und Riesenzellen.

Die aus astrozytären bzw. pleomorphen Zellelementen bestehenden "Mikrotumoren" stellen jedoch wesentlich seltener Befunde dar als die oligodendrozytären bzw. gemischten Herde.

2.2. Nachweis des S-100-Proteins

2.2.1. Immunodiffusion

Normales Hirngewebe und sechs Hirntumoren des Kaninchens wurden zunächst im Immunodiffusionstest auf das Vorkommen des S-100-Pro-

teins untersucht. Dabei zeigten sowohl das Groß- und Kleinhirn als auch die glialen Geschwülste positive Reaktionen, während Ependymome und andere Organproben keine Präzipitationen erzeugten (Tab. 2). Die Präzipitatlinien, die aus der Diffusion des Normalhirns resultierten, waren von deutlich stärkerer Intensität, als jene Linien, die durch die Tumoren erzielt wurden (Abb. 13a). Auch die semiquantitative Erfassung des S-100-Proteins, die eine Schätzung der S-100-Konzentration ermöglicht, ergab für die Tumoren wesentlich niedrigere Werte als für das normale Hirngewebe.

Tabelle 2: Ermittlung des S-100-Antigens im normalen Hirn und in Hirntumoren des Kaninchens mit Hilfe der zweidimensionalen Immunodiffusion (OUCHTERLONY-Test)

Material	Konzentration des Gewebsextraktes			
	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40
<u>A. Normalhirnproben</u>				
1. Großhirn	+	+	+	+
2. Kleinhirn	+	+	+	+
<u>B. Hirntumoren</u>				
1. Oligodendrogliom II	+	+	+	-
2. Astrozytom I	+	+	+	+
3. Astrozytom II	+	+	+	+
4. Primäres heteromorphes Gliom	+	+	+	+
5. Pleomorphes Gliom	+	+	+	-
6. Ependymom	-	-	-	-
<u>C. Organproben</u>				
1. Leber	-	-	-	-
2. Muskel	-	-	-	-

2.2.2. Quantitative Immunelektrophorese

In einer Reihe von Vorversuchen wurde das günstigste Konzentrationsverhältnis zwischen dem Anti-S-100-Serum und reinem S-100-Protein ermittelt. Bei der von uns benutzten Versuchsanordnung mit 30 μ l unverdünntem Antiserum für eine mit 7,5 ml Agarose beschichtete Platte lag die optimale Antigenkonzentration für reines S-100-Protein zwischen 25 und 800 ng/10 μ l (Abb. 3). Dabei hat sich gezeigt, daß die untere Grenze der immunelektrophoretischen Nachweisbarkeit bei 2,5 ng S-100/10 μ l bzw. 10 ng S-100/ μ g lösliches Protein liegt, zur Erhaltung quantitativ gut auswertbarer Präzipitate aber mindestens 25 ng S-100/10 μ l notwendig sind. Die genauesten quantitativen Ergebnisse werden mit S-100-Konzentrationen von 25 - 100 ng S-100/10 μ l erzielt, da bei höheren Konzentrationen die Standardabweichung vom Mittelwert der Präzipitathöhe zunimmt (Abb. 4).

Um die Frage zu klären, ob die Anwesenheit anderer Verbindungen, insbesondere anderer Proteine, die elektrophoretische Wanderung des S-100-Proteins beeinflusst, gaben wir zu verschiedenen Verdünnungen einer Normalhirnprobe die jeweils gleiche Menge reines S-100-Protein dazu, was zu einer dieser S-100-Proteinmenge entsprechenden Verlängerung der einzelnen Präzipitatpeaks führte (Abb. 14). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß der Nachweis des S-100-Proteins in Gehirn- bzw. Tumorproben durch noch vorhandene Proteine nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Gesamtproteinkonzentration in den für die Antigenverdünnungsreihe verwandten Ansätzen äußerst gering war. Diesbezügliche Proteinbestimmungen ergaben, daß nach Abschluß des Extraktionsverfahrens - 1 Stunde Zentrifugieren bei 105 000 g - die Proteinkonzentration im Überstand nur noch etwa 10 % der ursprünglich im Homogenat erfaßten Proteinmenge beträgt (Abb. 15).

Eine Carbamylierung mit Kaliumcyanat, wodurch bei der Elektrophorese die anodische Laufrichtung durch Blockierung der positiven Ladungen der Proteinmoleküle und damit Erhöhung ihrer negativen Nettoladung bewirkt wird, ist bei dem S-100-Protein nicht notwendig,

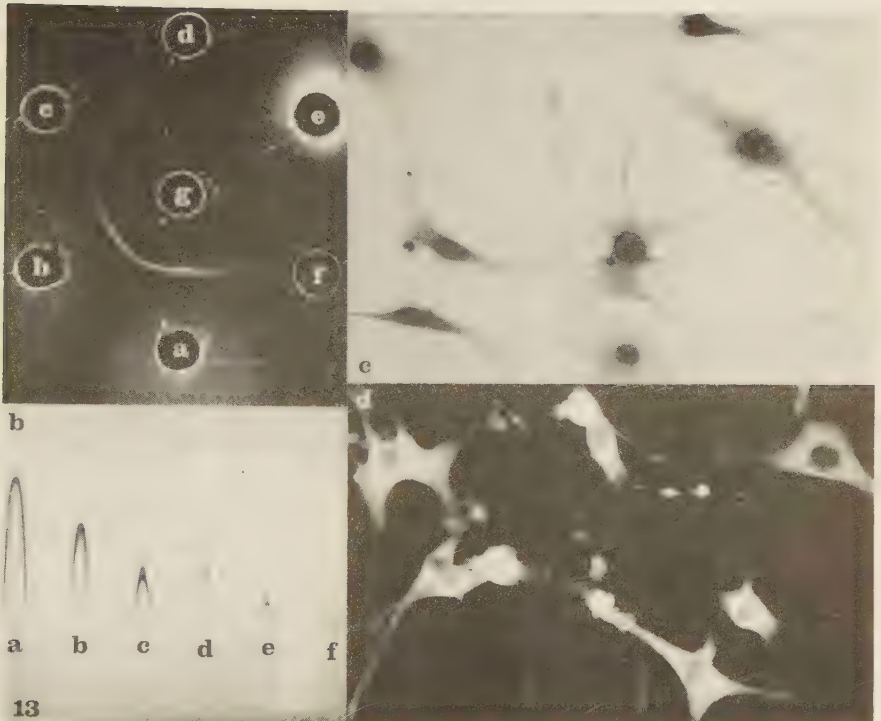


Abb. 13a Immunodiffusionsnachweis des S-100-Proteins: Tumor-extrakt in den Verdünnungen 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 (a - d), Leberextrakt (e) und Puffer (f) wurden in die äußeren Löcher, Anti-S-100-Serum (1 : 5) in das zentrale Loch (g) eingefüllt. Bei den Verdünnungen 1 : 5 und 1 : 10 gut erkennbare Präzipitationslinie, die bei den höheren Verdünnungen schwächer wird; keine Präzipitation zwischen Antiserum und Leberextrakt bzw. Puffer.

b Immunelektrophoretischer Nachweis des S-100-Proteins: Verschiedene Verdünnungen eines Normalhirn-Extraktes vom Rind (1 : 20, 1 : 40, 1 : 80) wurden in die Löcher a - c und die gleichen Verdünnungen eines Astrozytom-Extraktes in die Löcher d - f eingefüllt. Der Tumor enthält wesentlich weniger S-100-Protein als das Normalhirn.

c - d Immunofluoreszenznachweis des S-100-Proteins an der Gewebekultur (c) eines Astrozytoms; spezifische Fluoreszenz im Zytoplasma, während die Kerne nur unspezifisch angefärbt sind (d). (c - d 300 x)

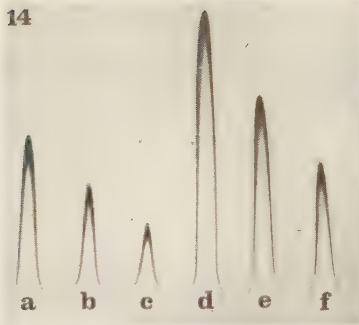
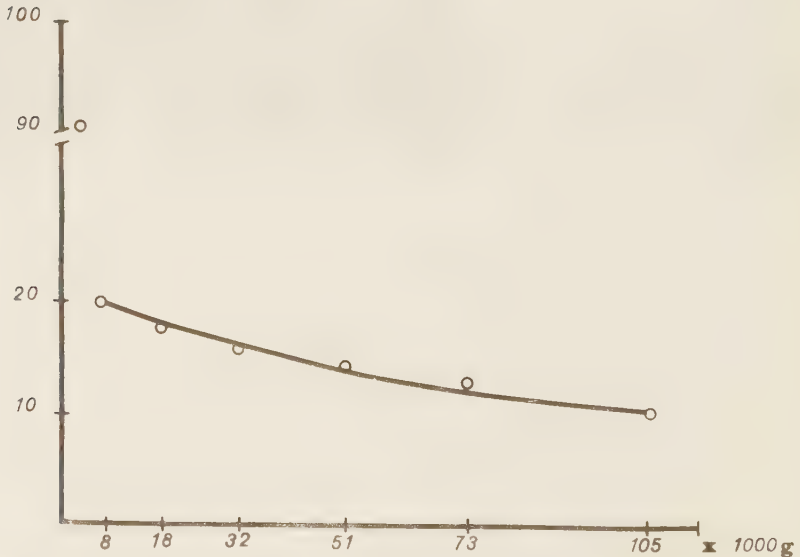


Abb. 14 Immunelektrophorese: Die Löcher a - c enthielten verschiedene Verdünnungen eines Normalhirn-Extraktes vom Rind (1 : 20, 1 : 40, 1 : 80), die Löcher d - f die gleichen Verdünnungen dieser Probe unter Zusatz von jeweils 100 ng reinem S-100-Protein. Die Verlängerung der Peaks d - f ist der zugesetzten S-100-Menge proportional.

mg prot./g (w/w)



15

Abb. 15 Einstündige Zentrifugation von Rinderhirnextrakt bei verschiedenen g-Einheiten. Der Proteingehalt des Hirns ist auf die Ordinate, die g-Werte auf die Abszisse eingetragen.

da es sich um ein saures und somit stark negativ geladenes Protein handelt. Die Carbamylierungsexperimente, die nach den von LAURELL (1972) für Serumproteine gemachten Angaben durchgeführt wurden, ergaben für das S-100-Protein unbefriedigende Ergebnisse.

Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt eine Aufstellung der mit Hilfe der quantitativen Immunelektrophorese im normalen NS-Gewebe verschiedener Species sowie in einigen Hirntumoren des Kaninchens errechneten S-100-Konzentrationen.

Das Hirntumormaterial, das uns für die Immunelektrophorese zur Verfügung stand, ist zahlenmäßig zwar gering, doch können über die erzielten Ergebnisse einige Aussagen gemacht werden.

Das S-100- Protein konnte in allen daraufhin untersuchten glialen Hirntumoren des Kaninchens nachgewiesen werden. Dabei kann aber festgestellt werden, daß die Tumoren wesentlich weniger S-100-Protein enthalten, als das normale Hirngewebe. Ebenso bestehen zwischen den einzelnen Hirntumoren bezüglich ihrer S-100-Konzentration erhebliche Unterschiede, wobei der S-100-Gehalt bei den relativ gut differenzierten Geschwülsten um ein vielfaches höher liegt, als bei den pleomorphen Tumoren.

2.2.3. Komplementbindungsreaktion

Die in Tabelle 4 aufgeführten Ergebnisse lassen erkennen, daß die S-100-Konzentration im Normalhirn um ein mehrfaches höher ist als in den Hirntumoren. Wie ein Vergleich mit den durch die quantitative Immunelektrophorese erzielten Werten zeigt, konnten diese durch die Komplementbindungsreaktion im wesentlichen bestätigt werden.

Bei Ependymomen konnte weder mit den beiden zuletzt genannten Methoden noch mit dem Immunodiffusionstest das S-100-Protein nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Immunelektrophoretisch ermittelte S-100-Konzentrationen in normalem NS-Gewebe verschiedener Species sowie in vier Hirntumoren des Kaninchens

Material	Species	S-100-Protein	
		$\mu\text{g/g}$ Feucht- gewicht	$\mu\text{g/mg}$ lösliches Protein
A. <u>Normales NS- gewebe</u>			
1. Großhirn	Affe	680	6,8
2. Kleinhirn	Affe	810	7,0
3. graue Substanz	Affe	495	7,3
4. weiße Substanz	Affe	720	8,2
5. Großhirn	Rind	630	7,8
6. Kleinhirn	Rind	830	9,2
7. Großhirn	Kaninchen	295	3,35
8. Rückenmark	Kaninchen	510	10,6
B. <u>Hirntumoren</u>			
1. Primär hetero- morphes Gliom	Kaninchen	200	2,04
2. Astrozytom II	Kaninchen	160	2,9
3. Pleomorphes Gliom	Kaninchen	20	0,36
4. Pleomorphes Gliom	Kaninchen	7	0,17

Tabelle 4: Übersicht der mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion ermittelten S-100-Konzentrationen im Normalhirn und einigen experimentell induzierten Hirntumoren des Kaninchens

Material	S-100-Protein
	$\mu\text{g}/\text{mg}$ lösliches Protein
A. <u>Normalhirn</u>	
Großhirn	8,542
B. <u>Hirntumoren</u>	
1. Astrozytom II	0,157
2. Primär heteromorphes Gliom	3,301
3. Primär heteromorphes Gliom	2,454
4. Pleomorphes Gliom	3,046

2.2.4. Immunofluoreszenz

Da bei den Techniken der Immunodiffusion, Immunelektrophorese und Komplementbindungsreaktion eine Verunreinigung der Tumorphomogenate mit normalem NS-Gewebe nicht ausgeschlossen werden kann, wurde bei fünf experimentellen Hirntumoren der zytologische Nachweis des S-100-Proteins mit Hilfe der Immunofluoreszenz durchgeführt.

Bei allen glialen Tumoren konnte sowohl im Gefrierschnitt als auch in der Gewebekultur (Abb. 13c)⁺ eine spezifische Fluoreszenz der Tumorzellen beobachtet werden, die im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 13d), während die Kerne eine offensichtlich unspezifische grünlige Anfärbung aufweisen. Die spezifisch fluoreszierenden zytoplas-

⁺ Herrn Prof. Dr. K. Zang, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, bin ich für die Züchtung der Tumoren zu Dank verpflichtet.

matischen Strukturen sind ungleichmäßig verteilt; die intensivste Fluoreszenz zeigt sich in den Perikaryen. Unterschiede in der Fluoreszenzintensität bestehen auch zwischen den einzelnen Zellen sowie zwischen verschiedenen Tumorarealen. Am schwächsten reagieren Riesenzellen und Zellen, die sich in der Mitose befinden. Nekrotische Areale und Verschleimungszonen zeigen keine spezifische Fluoreszenz.

E. DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit induzierten Hirntumoren des Kaninchens lassen sich in ihren makroskopischen und histologischen Strukturmerkmalen mit den von STAVROU (1969) sowie von KLEIHUES et al. bei dieser Species beschriebenen neurogenen Tumoren vergleichen. So fanden sich auch im eigenen Tumormaterial keine Sarkome, wie sie von SCHREIBER et al. beobachtet worden sind. Hinsichtlich der Vielfalt der erzeugten Blastome konnte jedoch ein im Vergleich zu den Befunden der genannten Autoren breiteres Spektrum festgestellt werden; hier wäre vor allem auf den relativ hohen Prozentsatz an Astrozytomen hinzuweisen.

Eine weitgehende Übereinstimmung mit STAVROU (1969) und KLEIHUES et al. besteht auch bezüglich der keineswegs zufälligen Lokalisationen dieser Neoplasien, wobei als Prädilektionsstellen in erster Linie die weiße Substanz der paraventrikulären Regionen und die Hippocampusformation zu nennen sind. Über eine Beteiligung des Kleinhirns ist in der Literatur bisher noch nicht berichtet worden. Im hier vorliegenden Tumormaterial fanden sich dagegen zwei "Mikro-Mischgliome", ein Oligodendrogliom und ein Astrozytom im Corpus medullare des Kleinhirns bzw. in der Nachbarschaft des 4. Ventrikels und in der Medulla oblongata. Die Kleinhirnrinde blieb frei. Das von SCHREIBER et al. beschriebene Vorkommen von Tumoren im Rückenmark bzw. deren Auftreten im PNS, wie dies von der Ratte (DRUCKREY et al., 1967; WECHSLER et al., 1969; JÄNISCH u. SCHREIBER, 1969; STAVROU, 1970 b) und dem Hund (STAVROU u. HAGLID, 1972) bekannt ist, konnte beim Kaninchen nicht beobachtet werden.

Bei der Mehrzahl der experimentell induzierten NS-Tumoren der verschiedenen Species handelt es sich in der Regel um histologisch maligne Neoplasien. Auch die aus unseren Versuchen hervorgegangenen Hirntumoren erwiesen sich überwiegend als Geschwülste der höheren Malignitätsstufen und wuchsen durchweg infiltrativ und destruierend. Bei einem Vergleich mit den geweblich zumeist gutartigen menschlichen NS-Tumoren muß dieser Umstand berücksichtigt werden.

MENNEL und ZÜLCH (1972) leiten nicht zuletzt aus dem geringen An-

teil der benignen und semibenignen Tumoren an den im Experiment erzeugten Neoplasien ihre Ansicht her, daß genauere Vergleiche mit den menschlichen NS-Tumoren und die sich daraus ergebenden pathogenetischen Erörterungen vorläufig noch nicht zulässig sind. Jedoch die Tatsache, daß auch die spontanen Gliome verschiedener Tier-species, insbesondere des Hundes, überwiegend als Malignome anzusehen sind (DAHME u. SCHIEFER), führt uns mit STAVROU (1971) zu der Annahme, daß nicht nur die unterschiedlichen Tumorspektren mit den damit verbundenen topographischen Verschiedenheiten speciesbedingt sind, sondern auch die gewebliche Differenzierung von der Species beeinflußt werden könnte. Das würde bedeuten, daß unter diesen Vorbehalten experimentelle und spontane, insbesondere maligne NS-Tumoren nebeneinander gestellt werden können.

Ein Fall in unserem Tumormaterial konnte nicht eingeordnet werden und wird als unklassifiziert aufgeführt. Die beschriebenen Tumorzellen ähneln am ehesten den Mikrogliazellen. Vor allem der sehr kleine und chromatinreiche, exzentrisch gelegene Zellkern mit seiner länglichen Form und die gewundenen, sich mehrfach aufspaltenden Zytoplasmafortsätze sprechen dafür, daß es sich hierbei um Zellen handelt, die sich mit der Hortegaglia vergleichen lassen. Unsere Zurückhaltung bei der Klassifikation erklärt sich daher, daß die Mikroglione ausgesprochen seltene Befunde darstellen und wir so gut wie keine Erfahrung mit diesem Tumortyp haben. Unter den bisher experimentell induzierten neurogenen Tumoren bei verschiedenen Species ist noch kein derartiger Fall beschrieben worden. Auch unter den menschlichen Spontantumoren machen sie nur einen ganz geringen Prozentsatz, ca. 0,25 %, aus (FISHER et al., 1959). Die wenigen beschriebenen Fälle (BAILEY u. CUSHING; FISHER et al.; MILLER u. RAMSDEN, 1963; RUBINSTEIN, 1964; OSTERTAG, 1965; ADAMS u. JACKSON, 1966) sind nicht unwidersprochen geblieben. So bezweifelt ZÜLCH (1956) überhaupt die Existenz eines aus Mikroglia bestehenden Tumors und hält die bislang beschriebenen Neoplasien für atypische bzw. nicht erkannte Oligodendrogliome bzw. Reticulosarkome.

Grundsätzlich kann jedoch kein Einwand dagegen erhoben werden, daß

die Proliferation von Mikrogliazellen tumoröse Form annehmen kann, da ihre Fähigkeit, sich bei entsprechender Stimulation zu vervielfältigen, niemals in Frage gestellt worden ist. Vielmehr gewinnen RUSSEL und RUBINSTEIN (1971) den Eindruck, daß diese Blastome oft übersehen bzw. fehldiagnostiziert worden sind. Dies erscheint aber verständlich, wenn man die Modifikationsfähigkeit der Mikroglia und die Problematik ihrer möglichen Abstammung und Differenzierung aus pluripotenten Reticulumzellen (CAMMERMAYER, 1970) bzw. aus dem undifferenzierten subependymären Glialager (LEWIS, 1968) berücksichtigt.

Bei einigen in der Hirnrinde lokalisierten, histologisch malignen Gliomen haben wir eine Anhäufung von Tumorzellen zur Meninx hin beobachtet, wobei diese Schranke von den Blastomen auch durchbrochen werden kann. STAVROU und DAHME (1969) sowie STAVROU (1971) konnten bei infiltrierend wachsenden experimentellen NS-Tumoren im Bereich der Tumordinvasionsfront eine im Vergleich zu den anderen Tumorbezirken und dem normalen Gewebe vermehrte Aktivität proteolytischer Enzyme nachweisen. Inwieweit diese vermehrte enzymatische Aktivität als Ausdruck einer erhöhten Enzymproduktion der Tumorzellen zur proteolytischen Destruktion des präexistenten Nachbargewebes gewertet werden darf, was für menschliche Mamma- und Reticulumcarcinome zutrifft (MOHR, 1967), oder ob dies lediglich auf der Zellanhäufung oder auf dem Freiwerden von Enzymen bei nekrobiotischen Vorgängen beruht (STAVROU, 1970 b), kann bislang nicht beantwortet werden. Zumindest ist bei der Übertragung der Verhältnisse von den nichtneurogenen Neoplasien auf die primären NS-Tumoren wegen deren biologischer Besonderheiten erhöhte Zurückhaltung geboten (STAVROU, 1971).

Bei mehreren Oligodendrogliomen und einigen Astrozytomen mit pleomorphem Charakter, den meisten primär heteromorphen Gliomen sowie bei allen pleomorphen Gliomen fanden sich in den Tumorrandgebieten teilweise recht massive Endothelproliferationen kleinerer Gefäße, insbesondere der Kapillaren, wobei viele Mitosen vorhanden waren. Diese Proliferation der Endothelien führte - wie auch bei den experimentellen Gliomen der Ratte (JÄNISCH u. SCHREIBER,

1969; STAVROU, 1971) - zur Ausbildung von Gefäßgirlanden und glomerulumentartigen Gefäß- bzw. Kapillarschlingen. Bei malignen Gliomen des Menschen, hier in besonderem Maße beim Glioblastom, zeigen sich ebenfalls derartige Endothelproliferationen. Die Entstehung von Schlingen-, Knäuel- und Glomerulumbildungen faßt ZÜLCH (1956) als bindegewebige Reaktion auf, die durch nekrotische Vorgänge bedingt ist.

Obwohl die Bedeutung dieser Gefäßveränderungen unbekannt ist, halten RUSSEL und RUBINSTEIN eine sarkomatöse Entartung dieser Endothelproliferationen für möglich, insbesondere im Hinblick auf die Bildung eines aus einem Glioblastom hervorgehenden gliosarkomatösen Mischtumors. Von KLEIHUES (1965) wird die Möglichkeit der Entwicklung eines mesodermalen Tumors innerhalb hirneigener Geschwülste auf der Grundlage derartiger exzessiver Endothelproliferationen in Frage gestellt, da ein solcher Fall mit sarkomatöser Umwandlung des Gefäßbindegewebes in der menschlichen Pathologie noch nicht mitgeteilt worden sei. Diese Aussage stimmt mit unseren Beobachtungen überein. Trotz massiver Proliferation der Endothelien mit zahlreichen Mitosen ist kein autonomes Wachstum, sondern immer nur die kontrollierte Entwicklung der Gefäßgirlanden aufgetreten.

Abschließend darf noch einmal darauf hingewiesen werden, daß diese Kapillarproliferationen nur bei solchen Tumoren aufzufinden waren, die deutliche Anzeichen von Pleomorphie aufwiesen, so daß wir mit ZÜLCH und MENNEL (1970) übereinstimmen, die diese Gefäßveränderungen als wichtigen Bestandteil der Pleomorphie werten.

Perivaskuläre Infiltrate aus kleinen, hyperchromatischen lymphoidzelligen Elementen waren besonders in den Randzonen bzw. in der Nachbarschaft der Oligodendrogliome II, der Astrozytome II, der primär heteromorphen und der pleomorphen Gliome anzutreffen, kamen aber auch in der Peripherie der Ependymome vor (Abb. 10).

Derartige perivaskuläre Infiltrate finden sich auch bei spontanen Oligodendrogliomen des Menschen (ZÜLCH, 1956) und verschiedener Tierspecies (STAVROU, 1971) sowie bei experimentellen Gliomen

der Ratte (JÄNISCH u. SCHREIBER, 1969) in den Tumorrandgebieten und bis in das normale Gewebe hinein.

Nach ZÜLCH (1956) ist die Herkunft dieser Zellen nicht zu bestimmen, da sie in Größe und Form zwischen Lymphozyten und Oligodendrozyten liegen und eine sichere Unterscheidungsmöglichkeit dieser beiden Zelltypen morphologisch nicht besteht. Es könnte sich um das Vordringen "unreifer" Zellen als Ausdruck einer besonderen Wachstumsart handeln (ZÜLCH, 1956). Diese Deutung der an das Gefäßsystem gebundenen Lymphoidzellansammlungen bezieht sich aber nur auf die Oligodendrogliome.

Auch als Reaktion auf zugrunde gegangenes Gewebe läßt sich dieses Phänomen kaum erklären, würde man dabei doch eher mit dem Auftreten von phagozytierenden Zellen rechnen. Naheliegender ist die Hypothese, daß es sich beim Auftreten von lymphoplasmozytären Infiltraten in spontanen bzw. experimentellen Gliomen und insbesondere in den dem Gliomgewebe benachbarten Hirnarealen um eine lokale immunologische Antwort des Tumorträgers auf tumorspezifische Antigene handeln könnte.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen traten die Hirntumoren beim Kaninchen in mehr als der Hälfte der Fälle multipel auf, ohne daß sich histologisch zwischen ihnen eine Verbindung nachweisen ließ. Dabei wurden mehrere voneinander getrennte Knoten eines Tumortyps, z. B. mehrere Astrozytome, seltener gefunden, als das gleichzeitige Auftreten verschiedener Tumorarten. So lagen in einem Hirn beispielsweise ein Oligodendrogliom, ein Ependymom sowie zwei kleinere Mischgliome nebeneinander vor.

Diese Befunde legen - in Analogie mit der von JÄNISCH et al. sowie von STAVROU und HAGLID (1973 a) im Rattenexperiment beobachteten multizentrischen Geschwulstentstehung - die Annahme einer primären Multiplizität dieser Tumoren nahe (Abb. 5b).

Neben meist multiplen Tumorknoten konnten wir in mehreren Fällen in weiten Bereichen des Gehirns oder manchmal sogar nahezu im Gesamtgehirn eine ausgedehnte diffuse Gliaproliferation mit vielen Mito-

sen und einzelnen riesenzellähnlichen Bildungen wahrnehmen. Überwiegend waren Oligodendroglia daran beteiligt, wobei es sich aber zumeist um eine Proliferation verschiedener Gliaelemente handelte.

Eine derartige Blastomatisierung eines ganzen Hirnareals mit Beteiligung mehrerer Gliatypen und das häufige Auftreten der primär heteromorphen Gliome ist auch bei den experimentellen Hirntumoren der Ratte beobachtet worden (THOMAS u. KERSTING, 1968; JÄNISCH u. SCHREIBER, 1969; STAVROU, 1971; STAVROU u. HAGLID, 1973 a) und hat zu der Annahme eines im Ganzen transformierten kleineren oder größeren Gewebfeldes im Sinne der WILLISSchen Feldtheorie geführt. ZÜLCH (1969) sowie MENNEL und ZÜLCH sehen jedoch diese Ansicht nach den vorgelegten Befunden als nicht ausreichend begründet an. Nach ihrer Meinung ist ein gleichmäßiges diffuses Wachstum nur bei den diffusen Gliomen zu sehen, während bei anderen Neoplasien eher ein zentraler Tumor-"Keim" und eine davon ausgehende blastomatöse Proliferation in die Umgebung hinein zu erkennen ist. Diese "unizentrische Betrachtungsweise" trifft nur für eine geringe Anzahl (23 %) der experimentellen Hirntumoren des Kaninchens zu.

Außer den oben beschriebenen Gliaproliferationen ist in diesem Zusammenhang noch über das Vorkommen von einzelnen, atypischen Zellen mit einem großen, dunklen Kern bzw. von einzelnen Riesenzellen im Bereich des Cortex mehrerer Gehirne zu berichten, ohne daß dabei eine Verbindung mit einem in anderen Hirnarealen liegenden Tumorverband vorhanden war. Dies wirft die Frage auf, ob diese Zellen als "Keimzentrum" eines Tumors im Sinne einer unizentrischen Geschwulstentstehung aufzufassen sind, oder ob sie in dem Gebiet eines bereits transformierten Gewebfeldes liegen. Nach den oben erhobenen Befunden scheint eine Entstehung dieser Riesenzellen durch endomitotische Teilung innerhalb eines transformierten Gewebfeldes möglich zu sein.

Die diffusen Gliaproliferationen mit Beteiligung verschiedener Gliatypen und mehrerer Riesenzellen sowie das häufige Auftreten der primär heteromorphen Gliome, die durch gleichzeitige Transformation mehrerer proliferationsfähiger Zellelemente eines Areals entstanden

sind, deuten darauf hin, daß experimentelle Hirntumoren aus gereiften Hirnbestandteilen hervorgehen können, indem das transformierte Gewebefeld gleichzeitig zu wachsen beginnt. Demnach konnte anhand der an Nitrosamid-induzierten Hirntumoren des Kaninchens gemachten Beobachtungen aufgezeigt werden, daß zumindest für einen Teil der experimentellen neurogenen Neoplasien die Feldtheorie von WILIS als formales pathogenetisches Prinzip vorstellbar ist.

Zur Überprüfung bzw. Absicherung der Histogenese der experimentellen neurogenen Tumoren des Kaninchens wurde das Vorkommen des gliaspezifischen S-100-Proteins, dem bei der histogenetischen Abklärung der weitestgehend entdifferenzierten Blastome entscheidende Bedeutung zukommt (STAVROU et al., 1974), mit Hilfe mehrerer immunologischer Tests untersucht.

Die Immunodiffusionstechnik hat sich zum Nachweis des S-100-Proteins als relativ einfache, aber nicht optimale Methode erwiesen. Die Proteinkonzentrationen lassen sich mit der semiquantitativen Immunodiffusion nur größenordnungsmäßig bestimmen, so daß eine genaue quantitative Erfassung nicht möglich ist. Aber auch der qualitative Nachweis des S-100-Proteins durch die Immunodiffusion ist nicht immer zuverlässig. Zum einen ist die Empfindlichkeit nicht groß genug, um auch geringe S-100-Konzentrationen zu erfassen, zum anderen kann es bei bestimmten Versuchsbedingungen (z. B. ungünstige pH-Verhältnisse im Agar) zu falschen positiven Reaktionen kommen, also zu "Präzipitaten" durch Proteinausfällungen, die nichts mit einer Antigen-Antikörperreaktion zu tun haben.

Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methode der quantitativen Immunelektrophorese zum Nachweis des S-100-Proteins ausgearbeitet. Dabei hat sich schon durch die Vorversuche mit reinem S-100-Protein die große Empfindlichkeit dieser Methode herausgestellt. Die untere Nachweisbarkeitsgrenze liegt im unteren ng-Bereich (2,5 ng S-100/10 µl Lösungsmittel bzw. 10 ng S-100/ µg lösliches Protein) und wird somit nur noch durch die Mikro-Komplementbindungsreaktion (MOORE u. PEREZ, 1966) übertroffen. Die weiteren Vorteile der quantitativen Immunelektrophorese in der hier

beschriebenen Form bestehen zum einen in der relativ einfachen Technik und zum anderen darin, daß das Untersuchungsergebnis in verhältnismäßig kurzer Zeit vorliegen kann.

Die Literaturangaben über die S-100-Konzentrationen im normalen NS-Gewebe und in den verschiedenen neurogenen Tumoren weichen teilweise stark voneinander ab. Ein Vergleich der einzelnen Werte wird dadurch erschwert, daß unterschiedliche, oft nicht genau definierte Bezugsgrößen verwendet werden. Die Angaben, die sich auf das Feuchtgewicht beziehen, sind wohl am sinnvollsten, weil damit absolute Werte aufgezeigt werden. Bei der Darlegung der S-100-Werte in $\mu\text{g}/\text{mg}$ lösliches Protein wird oft nicht klar herausgestellt, ob es sich dabei um die gesamten löslichen Proteine handelt, oder ob die Proteinbestimmung erst nach dem Zentrifugieren im Überstand erfolgt ist. Zudem kann der Proteingehalt der Blastome durch regressive Vorgänge beeinflusst, oder auch durch die Methodik (z.B. Extraktionsverfahren) verändert worden sein. Die Angabe der S-100-Gehalte, ausgedrückt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ lösliches Protein, kann nicht mehr als ein Anhaltspunkt sein. Ein verfälschtes Bild entsteht vor allem dann, wenn Ergebnisse dargestellt werden sollen, bei denen bei unterschiedlicher S-100-Konzentration auch der Proteingehalt verschieden ist. Nur unter Berücksichtigung dieser Umstände kann ein Vergleich der eigenen Werte mit den in der Literatur angegebenen erfolgen.

An dieser Stelle muß noch hinzugefügt werden, daß für die Immunelektrophorese und die Komplementbindungsreaktion nicht das gleiche Tumormaterial verwendet wurde, so daß die Werte im einzelnen voneinander abweichen.

MOORE et al. haben verschiedene NS-Regionen mehrerer Species mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion untersucht und S-100-Werte mitgeteilt, die etwa um die Hälfte niedriger sind als die eigenen durch die Immunelektrophorese und die Komplementbindungsreaktion ermittelten Ergebnisse. Demgegenüber stehen die auf Agarose-Acrylamidgeluntersuchungen beruhenden Angaben von GOMBOS et al. (1971), die ebenfalls wesentlich höher sind als die von MOORE et al., aber

dementsprechend gut mit den eigenen Werten übereinstimmen. Aufgrund unserer Ergebnisse können wir uns den Aussagen von MOORE et al. sowie MOORE und PEREZ (1968) insoweit anschließen, als auch wir im Kleinhirn und im RM bzw. in der weißen Substanz eine erheblich höhere S-100-Konzentration als im Großhirn bzw. in der grauen Substanz feststellen konnten.

Über die S-100-Konzentration in neurogenen Tumoren liegen zahlreiche Untersuchungsergebnisse vor. Sowohl bei den experimentellen Rattentumoren als auch bei den Spontangliomen werden die höchsten Werte in Oligodendrogliomen und die niedrigsten in Glioblastomen gefunden, während die S-100-Werte für Astrozytome und Mischgliome dazwischen liegen (BENDA, 1968 a; STAVROU et al., 1973; HAGLID u. STAVROU, 1973; HAGLID et al., 1974).

Diese Feststellung kann ebenso für die eigenen bei neurogenen Kaninchentumoren immunoelektrophoretisch ermittelten S-100-Konzentrationen getroffen werden, die auch in ihrer Höhe mit den Literaturangaben übereinstimmen.

Bei einem Vergleich mit den durch die Komplementbindungsreaktion erhaltenen Ergebnissen muß man allerdings eine Diskrepanz insofern erkennen, als der Wert für das Astrozytom am niedrigsten liegt. Als Grund dafür könnte man annehmen, daß es sich hier nur um einen Einzelfall handelt. Wahrscheinlicher ist jedoch die Erklärung, daß das Tumorgewebe einen hohen Proteingehalt aufwies, so daß der Wert für die S-100-Konzentration - bezogen auf das lösliche Protein - notwendigerweise klein ausfallen mußte und sich nur ein scheinbarer Widerspruch ergibt.

Die mit Hilfe der Immunofluoreszenz erhobenen Befunde werden als Bestätigung der Ergebnisse von Immunodiffusion, Immunelektrophorese und Komplementbindungsreaktion gewertet. Durch den zytologischen Nachweis des S-100-Proteins im Zytoplasma der am Tumorgeschehen beteiligten Gliazellen kann ausgeschlossen werden, daß die verwendeten Tumorphomogenate durch normales NS-Gewebe verunreinigt waren und nur durch eine derartige Kontamination ein positiver S-100-Nachweis zustande kam. Damit können auch die Untersu-

chungsergebnisse von HAGLID et al. (1973) und STAVROU et al. (1974) bestätigt werden.

Wie bereits erwähnt, weisen die am stärksten entdifferenzierten Gliome bei allen bislang untersuchten Species den niedrigsten S-100-Gehalt auf, was zu unterschiedlichen Interpretationen über einen Zusammenhang von S-100-Konzentration und Malignitätsgrad geführt hat. So glaubt BENDA (1968 a), daß möglicherweise intratumorale Hämorrhagien und Ödeme dafür verantwortlich sind, daß die Glioblastome nur wenig S-100-Protein enthalten. Diese Erklärung ist nicht von der Hand zu weisen, da sowohl die hier beschriebenen, als auch die von HAGLID et al. (1973) und STAVROU et al. (1974) erhobenen Immunofluoreszenzbefunde keine spezifische Fluoreszenz in nekrotischen und verschleimten Tumorealen ergeben haben. Andererseits ist aber auch die Fluoreszenzintensität von Zelle zu Zelle verschieden stark, so daß angenommen werden kann, daß mit zunehmender Entdifferenzierung die Fähigkeit der Tumorzellen zur S-100-Proteinsynthese beeinträchtigt wird. Außerdem zeigen die in der Mitose befindlichen Zellen eine nur schwache spezifische Fluoreszenz. Damit passen die Beobachtungen an einer, von einem Gliom der Ratte stammenden Gewebekultur zusammen, die in der log-Phase eine nicht meßbare Produktion von S-100-Protein zeigte (BENDA et al., 1968; PFEIFFER et al., 1970). Daß dies aber nicht unbedingt für jede Zelllinie zutreffen muß, ergibt sich aus den Untersuchungen an einer, von einem menschlichen Astrozytom stammenden Gewebekultur, deren Zellen das S-100-Protein nicht nur während der stationären, sondern auch während der Wachstumsphase anreicherten (HERSCHMAN).

Demnach können bis jetzt nur Spekulationen über einen Zusammenhang zwischen abnehmendem S-100-Gehalt bei höherem Malignitätsgrad der neurogenen Tumoren angestellt werden.

Abschließend kann festgestellt werden, daß durch den Nachweis des gliaspezifischen S-100-Proteins auch bei den weitestgehend entdifferenzierten Blastomen die Frage des neuroektodermalen bzw. glialen Ursprungs der Nitrosamid-induzierten neurogenen Tumoren des Kaninchens als beantwortet betrachtet werden darf. Dies gilt insbeson-

dere für jene Tumoren, welche die Voraussetzungen für die Durchführung immunologischer Tests erfüllten und bei denen das S-100-Antigen nachgewiesen werden konnte.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Durch intravenöse Verabreichung von 10 mg/kg N-Methyl-N-Nitrosos-harnstoff in 14tägigen Abständen wurden bei erwachsenen Kaninchen 42 Hirntumoren induziert. Die mittlere Induktionszeit betrug 273 Tage bei einer mittleren Gesamtdosis von 685 mg/Tier. Bei Tumoren, die in frischem Zustand gewonnen werden konnten, wurde der Nachweis des gliaspezifischen S-100-Proteins mit Hilfe mehrerer immunologischer Methoden (Immunodiffusion, Immunelektrophorese, Komplementbindungsreaktion, Immunofluoreszenz) durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse lassen sich, wie folgt, zusammenfassen.

1. Die Tumoren sind vorwiegend im Großhirn und nur vereinzelt in der weißen Substanz des Kleinhirns lokalisiert. Es handelt sich in der Regel um histologisch maligne Geschwülste, die der Gruppe der Oligodendrogliome, Astrozytome, primär heteromorphen Gliome, pleomorphen Gliome und Ependymome angehören.
2. Die anhand des vorgelegten Tumormaterials erhobenen Befunde lassen für einige der Nitrosamid-induzierten Hirntumoren des Kaninchens, ebenso wie bei der Ratte, die WILLISsche Auffassung von der Feldtransformation als formalpathogenetisches Entwicklungsprinzip wahrscheinlich erscheinen. Auf die primäre Multiplizität eines großen Teils der Tumoren wird hingewiesen.
3. Die Technik der quantitativen Immunelektrophorese wurde für die Quantifizierung des S-100-Proteins adaptiert und hat sich dabei als relativ einfache und genaue Methode erwiesen.
4. Mit Hilfe verschiedener immunologischer Techniken wird gezeigt, daß - außer den Ependymomen - alle daraufhin untersuchten experimentellen Hirntumoren das S-100 Protein enthalten und somit glialer Herkunft sein dürften. Eine Abnahme des S-100-Proteingehaltes mit zunehmender Entdifferenzierung der Neoplasien wird festgestellt.

SUMMARY

Forty-two brain tumours were induced in adult rabbits by N-methyl-N-nitrosourea (10 mg/kg) applied intravenously every two weeks. The induction time averaged 273 days, with an average total dose amounting to 685 mg/animal. The glia specific S-100 protein of tumours, which could be obtained in a fresh state, was determined by several immunological methods (immunodiffusion, immunoelectrophoresis, complement fixation, immunofluorescence). The obtained results may be summarized as follows:

1. The tumours are located predominantly in the cerebrum and only sparingly in the cerebellar white matter. As a rule one is dealing with histologically malignant tumours from the group of oligodendrogliomas, astrocytomas, primary heteromorphic gliomas, pleomorphic gliomas and ependymomas.
2. The findings derived from the tumour material available, do let appear it likely, that WILLIS' conception of field transformation, as a pathogenetic principle of development, is applicable for some of the nitrosamid induced brain tumours in rabbits as well as in rats. The primary multiplicity of a great part of the tumours is pointed out.
3. The quantitative immunoelectrophoresis technic has been adapted for the quantitative determination of S-100 protein and has proved to be a relatively simple and exact method.
4. It has been demonstrated by means of different immunological techniques that - with the exception of the ependymomas - all examined experimental brain tumours contain S-100 protein, indicating that they might be of glial origin. A decrease of S-100 protein with increasing dedifferentiation of the neoplasias has been established.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 51/E-13) durchgeführt.

G. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, J.H. and J.M. JACKSON:

Intracerebral tumours of reticular tissue: the problem of microgliomatosis and reticulo-endothelial sarcomas of the brain.

J. Path. Bact. 91, 369 - 381 (1966).

BAILEY, P. and H. CUSHING:

A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis.

Philadelphia: Lippincott Co. 1926.

BENDA, P.:

Protéine S-100 et tumeurs cérébrales humaines.

Rev. Neurol. 118, 368 - 372 (1968 a).

BENDA, P.:

Protéine S-100 et cellules gliales du rat.

Rev. Neurol. 118, 364 - 367 (1968 b).

BENDA, P., J. LIGHTBODY, G. SATO, L. LEVINE and W.H. SWEET:

A differentiated rat glial cell strain in tissue culture.

Science 161, 370 - 371 (1968).

BENDA, P., K. SOMEDA, J. MESSER and W.H. SWEET:

Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture.

J. Neurosurg. 34, 310 - 323 (1971).

CALISSANO, P., B.W. MOORE and A. FRIESEN:

Effect of calcium ion on S-100, a protein of the nervous system.

Biochemistry 8, 4318 - 4326 (1969).

CAMMERMEYER, J.:

A light microscopic study of microglial cells: mitosis, development and proliferation.

In: Proceedings of the VIth International Congress of Neuropathology, Paris 1970.

CICERO, T.J., W.M. COWAN, B.W. MOORE and V. SUNTZEFF:
The cellular localization of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2.

Brain Res. 18, 25 - 34 (1970).

CICERO, T.J., J.A. FERRENDELLI, V. SUNTZEFF and B.W. MOORE:

Regional changes in CNS levels of the S-100 and 14-3-2 proteins during development and aging of the mouse.

J. Neurochem. 19, 2119 - 2125 (1972).

COONS, A.H.: The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658 - 662 (1957).

DAHME, E. und B. SCHIEFER:

Intracranielle Geschwülste bei Tieren.

Zbl. Vet. Med. 7, 341 - 363 (1960).

DANNIES, P. and L. LEVINE:

Demonstration of subunits in beef brain acidic protein (S-100).

Biochem. biophys. Res. Commun. 37, 587 - 592 (1969).

DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN:

Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrosoharnstoff.

Naturwissenschaften 51, 144 - 146 (1964).

DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN:

Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff.

Z. Krebsforsch. 66, 389 - 408 (1965).

DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D. SCHMÄHL:
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.

Z. Krebsforsch. 69, 103 - 201 (1967).

DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN and S. IVANKOVIC:

N-Nitroso compounds in organotropic and transplacental carcinogenesis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 163, 676 - 696 (1969).

DUNN, J. and J.W. KERNOHAN:

Gliomatosis cerebri.

Arch. Pathol. 64, 82 - 91 (1957).

FILIPOWICZ, W., G. VINCENDON, P. MANDEL and G. GOMBOS:

Topographical distribution of fast and slow migrating fractions of beef brain S-100 protein fraction.

Life Sci. 7, 1243 - 1250 (1968).

FISHER, E.R., E.R. DAVIES and L.J. LEMMEN:

Reticulum-cell sarcoma of brain (microglioma).

Arch. Neurol. Psychiatr. 81, 591 - 598 (1959).

GOMBOS, G., G. VINCENDON, J. TARDY et P. MANDEL:

Hétérogénéité électrophorétique et préparation rapide de la fraction protéique S 100.

C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D. 263, 1533 - 1535 (1966).

GOMBOS, G., W. FILIPOWICZ and G. VINCENDON:

Fast and slow components of S-100 protein fraction: regional distribution in bovine central nervous system.

Brain Res. 26, 475 - 479 (1971 a).

GOMBOS, G., J.-P. ZANETTA, P. MANDEL et G. VINCENDON:

Étude de la fraction protéique neuro-spécifique S-100.

Biochimie 53, 635 - 655 (1971 b).

GOTH, R. and M.F. RAJEWSKY:

Persistence of 06-ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 71, 639 - 643 (1974).

GOTH, R.:

Puls-Carcinogenese durch das Nervensystem-spezifische Carcinogen N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoff.

Diss. Tübingen 1974.

GROC, W.:

Die zentripetal-radiale Immunodiffusion.

Clin. Chim. Acta 30, 365 - 368 (1970).

GÜTHERT, H. und R. WARZOK:

Zur karzinogenen Wirkung von Methyl- und Äthylnitrosoharnstoff bei Ratten nach transplazentarer und postnataler Applikation.

Zbl. allg. Path. 118, 115 - 123 (1974).

HAGLID, K.G., C.-A. CARLSSON and C.-A. THULIN:

Lactate dehydrogenase isoenzymes and proteins in human gliomas.

Neurochirurgia (Stuttg.) 13, 19 - 28 (1970).

HAGLID, K.G. and C.-A. CARLSSON:

An immunological study of some human brain tumors concerning the brain specific protein S-100.

Neurochirurgia (Stuttg.) 14, 24 - 27 (1971).

HAGLID, K.G.:

Acidic marker proteins for normal brain and tumours of the nervous system of man, rat and dog.

Thesis, Medical Faculty, University of Göteborg, Sweden, Göteborg 1973.

HAGLID, K.G. and D. STAVROU:

Water-soluble and pentanol-extractable proteins in human brain normal tissue and human brain tumours, with special reference to S-100 protein.

J. Neurochem. 20, 1523 - 1532 (1973).

HAGLID, K.G., C.-A. CARLSSON and D. STAVROU:

An immunological study of human brain tumors concerning the brain specific proteins S-100 and 14.3.2.

Acta neuropath. 24, 187 - 196 (1973).

HAGLID, K.G., D. STAVROU, W. WEIDENBACH and C.-A. CARLSSON:

On the emphasis on brain protein in neurooncology.

In: Proceedings of the VIIth International Congress of Neuropathology, Budapest 1974.

HERSCHMAN, H. R.:

Synthesis and degradation of a brain-specific protein (S-100 protein) by clonal cultured human glial cells.

J. biol. Chem. 246, 7569 - 7571 (1971).

HERSCHMAN, H. R., L. LEVINE and J. De VELLIS:

Appearance of a brain-specific antigen (S-100 protein) in the developing rat brain.

J. Neurochem. 18, 629 - 633 (1971).

HYDÉN, H. and B. McEWEN:

A glial protein specific for the nervous system.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 55, 354 - 358 (1966).

HYDÉN, H. and P. W. LANGE:

Brain-cell protein synthesis specifically related to learning.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 65, 898 - 904 (1970).

IVANKOVIC, S.:

Selektive Erzeugung von Geschwülsten im Gehirn und Nervensystem.

In H. E. BOCK (ed.): Krebsforschung und Krebsbekämpfung Bd. VI, pp. 97 - 101. München - Berlin - Wien: Urban & Schwarzenberg 1967.

JÄNISCH, W.:

Die Induktion von experimentellen Hirngeschwülsten mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen.

Z. Krebsforsch. 68, 224 - 233 (1966).

JÄNISCH, W. und D. SCHREIBER:

Experimentelle Hirngeschwülste bei Kaninchen nach Injektion von Methylnitrosoharnstoff.

Naturwissenschaften 54, 171 - 172 (1967).

JÄNISCH, W. und D. SCHREIBER:

Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems.

Jena: Fischer 1969.

JÄNISCH, W., D. SCHREIBER, R. WARZOK und G. OSSKE:
Frühstadien von Geschwülsten des Zentralnervensystems. Experimentell-morphologische Untersuchung.
Exp. Path. 4, 60 - 68 (1970).

KABAT, E. and M. MAYER:
Complement and complement fixation.
In: Experimental Immunochemistry 2nd ed., pp. 136 - 158. Springfield: Thomas 1961.

KESSLER, D., L. LEVINE and G.-D. FASMAN:
Some confirmational and immunological properties of a bovine brain acidic protein.
Biochemistry 7, 758 - 764 (1968).

KERNOHAN, J.W., R.F. MABON, H. J. SVIEN and A.W. ADSON:
Symposium on a new and simplified concept of gliomas.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 24, 53 - 75 (1949).

KERSTING, G.:
Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.
Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer 1961.

KLEIHUES, P.:
Gibt es im Gehirn echte Kompositionstumoren?
Z. Krebsforsch. 67, 262 - 271 (1965).

KLEIHUES, P., K.J. ZÜLCH, S. MATSUMOTO and U. RADKE:
Morphology of malignant gliomas induced in rabbits by systemic application of N-Methyl-N-nitrosourea.
Z. Neurol. 198, 65 - 78 (1970).

KLEIHUES, P.:
Alkylation of rat brain nucleic acids and the induction of gliomas.
In: Proceedings of the VIIth International Congress of Neuropathology, Budapest 1974.

v. KREYBIG, T.:

Die Wirkung einer carcinogenen Methylnitrosoharnstoff-Dosis auf die Embryonalentwicklung der Ratte.

Z. Krebsforsch. 67, 46 - 50 (1965).

KUPFER, G. und M. KUPFER:

Über verschiedene Wirkungen von N-Methyl-N-nitrosoharnstoff bei Ratten.

Zbl. allg. Path. 114, 458 - 475 (1971).

LAURELL, C.-B.:

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Anal. biochem. 15, 45 - 52 (1966).

LAURELL, C.-B.:

Electroimmuno assay.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 124, 21 - 37 (1972).

LEVINE, L. and B.W. MOORE:

Structural relatedness of a vertebral brain acidic protein as measured immunochemically.

Neurosci. Res. Progr. Bull. 3, 18 - 22 (1965).

LEWIS, P.D.:

The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia.

Brain 91, 721 - 736 (1968).

LIGHTBODY, J., S.E. PFEIFFER, P.L. KORNBLITH and H. HERSCHEMAN:

Biochemically differentiated clonal human glial cells in tissue culture.

J. Neurobiol. 1, 411 - 417 (1970).

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL:
Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951).

MAGEE, P.N. and J.M. BARNES:

The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.

Brit. J. Cancer 10, 114 - 122 (1956).

MAGEE, P.N. and E. FARBER:

Toxic liver injury and carcinogenesis.

Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo.

Biochem. J. 83, 114 - 124 (1962).

MAGEE, P.N. and J.M. BARNES:

Carcinogenic nitroso compounds.

Advanc. Cancer Res. 10, 164 - 246 (1967).

MENNEL, H.D. und K.J. ZÜLCH:

Formale Pathogenese experimenteller Hirntumoren.

Acta neuropath. (Berl.) 21, 140 - 153 (1972).

MILLER, A.A. and F. RAMSDEN:

Primary reticulosis of the central nervous system. "Microgliomatosis".

Acta neurochir. 11, 439 - 478 (1964).

MOHR, H.J.:

Die L-Leucinaminopeptidase (LAP) in Tumorzellen und ihre Bedeutung beim Tumorwachstum.

Z. Path. 77, 107 - 124 (1967).

MOORE, B.W.:

A soluble protein characteristic of the nervous system.

Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 739 - 744 (1965).

MOORE, B.W. and D. MCGREGOR:

Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver.

J. biol. Chem. 240, 1647 - 1653 (1965).

MOORE, B.W. and V.J. PEREZ:

Complement fixation for antigens on a picogram level.

J. Immun. 96, 1000 - 1005 (1966).

MOORE, B.W. and V.J. PEREZ:

Specific acidic proteins of the nervous system.

In: F.D. Carlson (ed.): Physiological and biochemical aspects of nervous integration, pp. 343 - 360. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, Inc. 1968.

MOORE, B.W., V.J. PEREZ and M. GEHRING:

Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system.

J. Neurochem. 15, 265 - 272 (1968).

MÜLLER, W. und R. SCHRÖDER:

Zur Diagnostik der Gliome.

Neurochirurgia (Stuttg.) 11, 30 - 36 (1968).

NEVIN, S.: Gliomatosis cerebri.

Brain 61, 170 - 191 (1938).

OSTERTAG, B.:

Primäre zentrale Reticulose und Mikroglia (Reticulo-Mikroglomatose).

Arch. Psychiat.Nervenkr. 206, 662 - 676 (1965).

OUCHTERLONY, Ö.:

In vitro method for testing the toxin-producing capacity of Diphtheria bacteria.

Acta path. microbiol. Scand. 25, 186 - 191 (1948).

OUCHTERLONY, Ö.:

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II.

Progr. Allergy 6, 30 - 154. Basel - New York: Karger 1962.

PEREZ, V.J., J.W. OLNEY, T.J. CICERO, B.W. MOORE and B.A. BAHN:

Wallerian degeneration in rabbit optic nerve: cellular localization in the central nervous system of the S-100 and 14-3-2 proteins.

J. Neurochem. 17, 511 - 519 (1970).

PFEIFFER, S.E., H.R. HERSCHMAN, J. LIGHTBODY and G. SATO:
Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the
nervous system.

J. cell. Physiol. 75, 329 - 340 (1970).

PFEIFFER, S.E., P.L. KORNBLITH, H.L. CARES, J. SEALS and
L. LEVINE:

S-100 protein in human acoustic neurinomas.

Brain Res. 41, 187 - 193 (1972).

RINGERTZ, N.:

"Grading" of gliomas.

Acta path. microbiol. Scand. 27, 51 - 64 (1950).

RUBINSTEIN, L. J.:

Microgliomatosis.

Acta neurochir. Suppl. 10, 201 - 212 (1964).

RUSSEL, D.S. and L.J. RUBINSTEIN:

Pathology of tumours of the nervous system.

3rd ed. London: Arnold 1971.

SCHEINKER, I.M. and J.P. EVANS:

Diffuse cerebral glioblastosis.

J. Neuropath. exp. Neurol. 2, 178 - 189 (1943).

SCHIEFER, B.:

Über die experimentelle Erzeugung von Gehirntumoren mit Methyl-
cholanthren.

Zbl. Neurochir. 18, 360 - 375 (1958).

SCHIEFER, B.:

Zur Morphologie experimenteller Hirntumoren.

Acta neuropath. Suppl. 1, 19 - 25 (1962).

SCHIEFER, B. und E. DAHME:

Primäre Geschwülste des ZNS bei Tieren.

Acta neuropath. 2, 202 - 212 (1962).

SCHNEIDER, D.J., R.H. ANGELETTI, R.A. BRADSHAW, A. GRASSO and B.W. MOORE (Eds.): *Proteins of the nervous system*. New York: Raven Press 1973.

SCHREIBER, D., W. JÄNISCH, R. WARZOK und H. TAUSCH:
Die Induktion von Hirn- und Rückenmarktumoren bei Kaninchen mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff.
Z. ges. exp. Med. 150, 76 - 86 (1969).

SELIGMAN, A.M. and M.J. SHEAR:
Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene.
Amer. J. Cancer 37, 364 - 395 (1939).

SLAGEL, D.E., C.B. WILSON and P.B. SIMMONS:
Polyacrylamide electrophoresis and immunodiffusion studies of brain tumor proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 490 - 496 (1969)

STAVROU, D.:
Zur Morphologie und Histochemie experimentell induzierter Hirntumoren beim Kaninchen.
Z. Krebsforsch. 73, 98 - 109 (1969).

STAVROU, D. und E. DAHME:
Beitrag zur Enzymhistochemie experimentell induzierter Hirntumoren beim Kaninchen.
Verh. dtsh. Ges. Path. 53, 548 - 553 (1969).

STAVROU, D.:
Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. I. Morphologische Befunde.
Acta neuropath. (Berl.) 15, 220 - 230 (1970 a).

STAVROU, D.:
Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. II. Enzymhistochemische Befunde.
Acta neuropath. (Berl.) 15, 231 - 239 (1970 b).

STAVROU, D., B. SCHIEFER und R. SWOBODA:
Zur Frage des "Grading" von Gliomen bei Tieren.
Beitr. path. Anat. 140, 182 - 193 (1970).

STAVROU, D.:
Zur vergleichenden Pathologie der Tumoren des Nervensystems.
Zbl. Vet. Med. A 18, 585 - 645 (1971).

STAVROU, D., K.G. HAGLID and W. WEIDENBACH:
The brain specific proteins S-100 and 14.3.2 in experimental brain tumors of the rat.
Z. ges. exp. Med. 156, 237 - 242 (1971).

STAVROU, D. und K.G. HAGLID:
Experimentell induzierte Tumoren des peripheren Nervensystems beim Hund.
Naturwissenschaften 59, 317 - 318 (1972).

STAVROU, D. und K.G. HAGLID:
Morphologische und immunologische Untersuchungen zur Histogenese experimenteller Hirntumoren.
J. neurol. Sci. 20, 39 - 50 (1973 a).

STAVROU, D. and K.G. HAGLID:
Water soluble proteins from rat brain and from experimental tumors of rat nervous system.
Z. Krebsforsch. 79, 249 - 254 (1973 b).

STAVROU, D., K.G. HAGLID and L. RÖNNBÄCK:
The S-100 protein in rat brain and in methylnitrosourea-induced tumors of the rat nervous system.
Europ. Neurol. 10, 168 - 178 (1973).

STAVROU, D., K.G. HAGLID, H. ZANKL und K.D. ZANG:
Immunhistochemischer Nachweis des hirnspezifischen S-100-Proteins bei experimentellen Hirntumoren.
Z. Krebsforsch. 82, 75 - 82 (1974).

STEWART, J.A.:

Tissue specific brain S-100. A demonstration of multiple proteins.
Biochim. biophys. Acta 263, 178 - 192 (1972).

SVIRIDOV, S.M. , L. J. KOROCHKIN, V.N. IVANOV, E.J. MALETS-KAYA and T.K. BAKHTINA:

Immunohistochemical studies of S-100 protein during postnatal carcinogenesis of the brain of two strains of rats.

J. Neurochem. 19, 713 - 718 (1972).

SWENBERG, J.A., A. KOESTNER and W. WECHSLER:

The induction of tumors of the nervous system with intravenous methylnitrosourea.

Lab. Invest. 26, 74 - 85 (1972).

SYMEONIDIS, A.:

Tumors induced by 2-acetyl-amino-fluorene in virgin and breeding females of five strains of rats and in their offspring.

J. nat. Cancer Inst. 15, 539 - 549 (1954).

TARDY, J., G. GOMBOS, G. VINCENDON et P. MANDEL:

Variations interspécifiques de la fraction protéique S-100 du cerveau des mammifères.

C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D. 267, 669 - 672 (1968).

THOMAS, C. und G. KERSTING:

Zur Morphologie der durch Methylnitrosoharnstoff erzeugten Hirntumoren bei der Ratte.

Naturwissenschaften 51, 144 - 145 (1964).

THOMAS, C., J.L. SIERRA und G. KERSTING:

Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-Nitroso-N-methylharnstoff.

Naturwissenschaften 54, 228 - 229 (1967).

THOMAS, C. und G. KERSTING:

Pathomorphologische Vergleichsuntersuchungen diaplazentar und postnatal erzeugter Hirntumoren.

Verh. dtsh. Ges. Path. 52, 384 - 388 (1968).

THOMAS, C., J.L. SIERRA und G. KERSTING:

Neurogene Tumoren bei Ratten nach intraperitonealer Applikation von N-Nitroso-N-methyl-harnstoff.

Naturwissenschaften 55, 183 (1968).

THOMAS, C. und R. BOLLMANN:

Untersuchungen zur Organotropie der krebserzeugenden Wirkung des N-Nitroso-N-methyl-Harnstoffes (MNH) an Ratten.

Experientia 25, 50 - 51 (1968).

VINCENDON, G., A. WAKSMAN, K. UYEMURA, J. TARDY and G. GOMBOS:

Ultracentrifugal behavior of beef brain S-100 protein fraction.

Arch. Biochem. 120, 233 - 235 (1967).

WARZOK, R., J. SCHNEIDER, D. SCHREIBER and W. JÄNISCH:
Experimental brain tumours in dogs.

Experientia 26, 303 - 304 (1970).

WECHSLER, W., P. KLEIHUES, S. MATSUMOTO, K.J. ZÜLCH, S. IVANKOVIC, R. PREUSSMANN and D. DRUCKREY:

Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 360 - 408 (1969).

WECHSLER, W., S.E. PFEIFFER, J.A. SWENBERG and A. KOESTNER:

S-100 protein in methyl- and ethylnitrosourea induced tumors of the rat nervous system.

Acta neuropath. 24, 287 - 303 (1973).

WEIL, A.:

Experimental production of tumors in the brains of white rats.

Arch. Path. 26, 777 - 790 (1938).

WILLIS, R.A.:

Pathology of tumours.

London: Butterworth 1960.

ZIMMERMAN, H.M. and H. ARNOLD:

Experimental brain tumors. II. Tumors produced with benzpyrene.

Amer. J. Path. 19, 939 - 955 (1943).

ZIMMERMAN, H.M.:

The nature of gliomas as revealed by animal experimentation.

Amer. J. Path. 31, 1 - 29 (1955).

ZOMZELY-NEURATH, C., C. YORK and B.W. MOORE:

In vitro synthesis of two brain-specific proteins (S-100 and 14-3-2) by polyribosomes from rat brain.

Arch. Biochem. Biophys. 155, 58 - 69 (1973).

ZÜLCH, K.J.:

Biologie und Pathologie der Hirngeschwülste.

In: OLIVECRONA-TÖNNIS, Hdb. der Neurochirurgie Bd. III.

Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer 1956.

ZÜLCH, K.J.:

Gibt es Beziehungen in den Befunden der experimentellen und spontanen neurogenen Tumoren?

Arzneimittel-Forsch. 19, 1503 - 1507 (1969).

ZÜLCH, K.J. and H.D. MENNEL:

Recent results on chemically induced tumors of the nervous system.

In: Proceedings of the VIth International Congress of Neuropathology, Paris 1970.

Herrn Professor Dr. E. Dahme möchte ich dafür danken, daß er mir nicht nur die Anfertigung dieser Arbeit in seinem Hause ermöglichte, sondern auch für die in großzügiger Weise gewährte Unterstützung.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. D. Stavrou für die Stellung des Themas und die mir jederzeit gewährte Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 18. 4. 1949 wurde ich als dritte Tochter des Kreisschulrates Dr. Fritz Lübbe und seiner Ehefrau Dr. Gertrud Lübbe, geb.Eckardt, in Sobernheim geboren.

Von 1955 an besuchte ich die Volksschule in Sobernheim und wechselte 1959 zum Staatlichen Neusprachlichen Gymnasium Sobernheim über, an dem ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und bestand am 11. 9. 1972 die Tierärztliche Prüfung.

Mit der vorliegenden Arbeit begann ich im Herbst 1972 und war von Januar bis Oktober 1974 am Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

